

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**AKCİĞER KANSER HÜCRESİ İLE İNSAN ALVEOLAR EPİTEL  
HÜCRESİNİN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**Ezgi ERMİŞ KAYA**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2015**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK**

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

11/12/2015

Ezgi ERMİŞ KAYA

## ÖZET

Doktora Tezi

### AKCİĞER KANSER HÜCRESİ İLE İNSAN ALVEOLAR EPİTEL HÜCRESİNİN ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

Ezgi ERMİŞ KAYA

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Suna CEBESÖY

Akciğer kanser hücreleri, etrafındaki hücreleri etkileyen sinyaller oluşturarak bir Tümör Mikro Çevresi (TMC) oluşturmaktadır. Bu çalışmada; TMC etkileşimine dayanarak tümörlü hücrelerin, tümöre yakın dokuda büyüyen sağlıklı alveol epitel hücrelerin fonksiyonlarını nasıl etkiledikleri araştırılmıştır. Primer insan alveolar epitel hücreler (AT2), akciğer adenokarsinoma hücreleri (A549 ve H1975) ile ko-kültürü yapılmıştır veya adenokarsinoma hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılmıştır. Alveolar bariyer gerginliğinin göstergesi olarak Transepitel Elektriksel Direnç (TEER) ölçülmüştür. AT2 hücre proliferasyonu kristal viyole ile ölçülmüştür. Ussing düzeneğinde Epitel Na kanallarının (ENaK) ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz ölçümü ve bunların alt ünitelerinin mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi ile  $\text{Na}^+$ -iyon transportu değerlendirilmiştir. Glikoz ve laktat düzeyi metabolik faaliyeti belirlemek için değerlendirilmiştir.  $\text{O}_2$  bağımlı reaksiyonların rolünü değerlendirmek için normal ve gaz geçirgen plateler kullanılmıştır. Çalışmamızın bulgularına göre; koşullandırılmış besiyeri ENaK ile  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesini stimüle etmektedir ve TEER'i arttırmaktadır. Adenokarsinoma hücreleri AT2 hücrelerinin proliferasyonunu etkilememektedir Adenokarsinom hücreleri ile AT2 ko-kültürü TEER'i arttırmaktadır ve 24 saatlik stimülasyondan sonra ENaK ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi azalmaktadır. Bu azalma  $\text{O}_2$  geçirgen plakalar sayesinde önlenmiştir. Adenokarsinoma hücre ile AT2 ko-kültürü, plate türünden bağımsız olarak her iki plate tipinde de glikozu azaltmış ve laktatı arttırmıştır. Adenokarsinoma hücreleri ile AT2 ko-kültürü 24. saatte  $\beta$ -ENaK alt biriminin mRNA ekspresyonunu arttırmıştır. Uzun süreli maruziyet, oksijenasyonun azalmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar, adenokarsinoma hücrelerinin çözünür faktörler aracılığı ile sağlıklı AT2 hücrelerini stimüle ettiğini göstermektedir. Ayrıca, adenokarsinoma hücrelerine uzun süreli maruziyet, AT2 hücrelerinin fonksiyonunu hipoksi aracılığı ile azalttığı tespit edilmiştir.

**Aralık 2015, 108 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Akciğer Kanseri, Alveolar Epitel Tip 2 Hücre (AT2), Epitel Sodyum Kanalları (ENaK), Sodyum Potasyum Pompası ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz), Akciğer Adenokarsinoma Hücre Serileri (A549 ve H1975), Hipoksi

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### INVESTIGATING THE INTERACTION OF LUNG CANCER CELLS WITH HUMAN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS

Ezgi ERMIŞ KAYA

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Suna CEBESOY

Lung cancer cells generate a microenvironment by releasing signals that affect surrounding cells. Based on this interaction, it was investigated that cancer cells affect the function of healthy alveolar epithelium where growing in close vicinity of tumor tissue in this study. Primary human alveolar epithelial cells (AT2) were in co-culture with adenocarcinoma cells (A549 and H1975) or with conditioned media from adenocarcinoma cells. The transepithelial electrical resistance (TEER) was measured as indicator of barrier tightness. Proliferation of AT2 was measured with crystal violet. Na<sup>+</sup>-ion transport was evaluated by measuring of epithelial Na channels (ENaC) and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Ussing chambers and by determining mRNA expression of their subunits. Levels of glucose and lactate was evaluated for assessing metabolic activity. Normal and gas-permeable culture plates were used to evaluate the role of O<sub>2</sub> dependent reactions. According to our results, conditioned media increased TEER and stimulated ENaC and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. Proliferation of AT2 cells was not affected. Co-culture with adenocarcinoma cells increased TEER and after 24 hours stimulation decreased ENaC and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity. This decrease was prevented by culture on gas permeable plates. Co-culturing AT2 with adenocarcinoma cells decreased glucose and increased lactate in the culture medium from both plate types independent of the type of culture plate used. Co-culture with adenocarcinoma cells increased the mRNA expression of β-ENaC subunit at 24. hours. Longer exposure caused a decrease of oxygenation. These results indicate that adenocarcinoma cells stimulate healthy alveolar epithelium mediated by soluble factors. Also, it was detected that prolonged exposure to adenocarcinoma cells decrease AT2 function by hypoxia.

**December 2015, 108 pages**

**Key Words:** Lung Cancer, Alveolar Epithelial Cells Type 2 (AT2) , Epithelial Sodium Channel (EnaK) , Sodium potassium pump (Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup>-ATPase), Lung Adenocarcinoma Cell Lines (A549 and H1975), Hypoxia

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana rehberlik eden, ilgisi ve manevi desteği ile de her zaman yanımda olan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Suna CEBESOY'a, (Ankara Üniversitise Biyoloji Anabilim Dalı) bilgi ve deneyimleri ile tez çalışmama ışık tutan, pratik çözümleri ile bana yol gösteren, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devamında her türlü desteği sağlayan ve bilime dair prensiplerini kendime örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Heimo Mairbaeurl'a, tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli çalışma arkadaşım Emel BALOĞLU'na, yine desteklerinden ve yardımlarından dolayı Spor Hekimliği çalışanlarından Christiane HERTH ve Sonja ENGELHARDT'a, tezimin ilerlemesinde bana bakış açıları kazandıran değerli hocalarım Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a, (Ankara Üniversitise Biyoloji Anabilim Dalı) bilgi Prof Dr. Kazime Gonca AKBULUT'a,(Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı) tez çalışmam süresince en sıkıntılı olduğum anlarda yanımda olan moral ve neşe kaynağı canım arkadaşım Safak CHASAN'a, maddi ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan, en yakın destekçim, hayat yoldaşım ve sevgili eşim Taylan Özgür KAYA'ya, tüm sıkıntı ve zorluklara rağmen bugünlere gelmeme ve bu güzellikleri yaşamama vesile olan aileme ve adını yazamadığım emeği geçen herkese çok teşekkür ederim.

Tez projesi Alman Akciğer Merkezi (DLZ-TLR) tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmanın deneyleri, Prof. Dr. Heimo Mairbaeurl gözetimi altında Heidelberg Üniversite Hastanesi Spor Hekimliği Araştırma Laboratuvarlarında yapılmıştır.

Ezgi ERMİŞ KAYA

Ankara, Aralık 2015

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	5
2.1 Akciğerler.....	5
2.1.1 Alveoller .....	7
2.1.2 Kan-hava bariyeri .....	8
2.1.3 Alveolar pnömosit hücreleri.....	9
2.1.3.1 Alveolar tip I hücreler (AT1) .....	9
2.1.3.2 Alveolar tip II hücreler (AT2).....	11
2.2 Alveolar Reabsorbsiyon.....	13
2.2.1 Epitel sodyum (Na <sup>+</sup> ) kanalları (ENaK) .....	15
2.2.2 Sodyum potasyum pompası (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz enzimi) .....	16
2.2.3 Alveolar reabsorbsiyonu etkileyen faktörler .....	18
2.3 Akciğer Kanseri.....	19
2.3.1 Akciğer kanseri sınıflandırılması.....	21
2.3.1.1 Küçük hücreli akciğer karsinoma (KHAK) .....	21
2.3.1.2 Küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma (KHOAK).....	22
2.3.1.2.1 Adenokarsinom .....	22
2.3.1.2.2 Büyük hücreli karsinom .....	23
2.3.1.2.3 Skuamöz hücreli karsinom.....	23
2.3.2 Akciğer kanseri moleküler biyolojisi.....	24
2.3.3 Tümör mikro çevresi.....	26
2.3.4 Kansersizasyon alanı .....	27

<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
3.1 Çözeltiler .....	30
3.2 Yöntemler.....	35
3.2.1 Hücre kültürü .....	35
3.2.1.1 Alveolar epitel tip-2 (AT2) hücre izolasyonu.....	36
3.2.1.2 Ko-kültür ve koşullandırılmış besiyeri deneyleri.....	38
3.2.2 Transepitel elektriksel rezitans (TEER) ölçümü.....	40
3.2.3 Ussing düzeneği deneyi .....	40
3.2.4 Proliferasyon deneyi.....	41
3.2.5 Glukoz ve laktat ölçümü .....	42
3.2.6 Ekzozom izolasyonu ve uygulanması .....	42
3.2.7 Büyüme faktörleri ve sitokin düzeylerinin luminex yöntemi ile belirlenmesi .....	43
3.2.8 Toplam RNA izolasyonu.....	44
3.2.9 Toplam RNA'dan cDNA eldesi .....	45
3.2.10 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PCR) .....	46
3.2.11 Protein miktar tayini.....	47
3.2.12 Protein düzeylerinin western blot yöntemi ile belirlenmesi .....	47
3.2.12.1 Membrandan antikor uzaklaştırılması (Stripping) .....	49
3.2.13 Verilerin değerlendirilmesi .....	49
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>51</b>
4.1 A549 Adenokarsinom Hücre Serisi ve AT2 Hücreleri ile Yapılan Deney Bulgular .....	51
4.1.1 AT2 ile A549 koşullandırılmış besiyeri bulguları .....	51
4.1.2 AT2 ile A549 hücresi ko-kültür bulguları.....	56
4.1.2.1 AT2 ile A549 ko-kültürü metabolik aktivite bulguları.....	57
4.1.3 AT2 ile A549 geçirgen plate ko-kültür bulguları .....	58
4.1.3.1 AT2 ile A549 geçirgen plate ko-kültürü metabolik aktivite bulguları.....	60
4.1.4 A549 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları .....	60
4.1.4.1 A549 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları .....	60

4.1.4.2 A549 ile AT2 yapılan ko-kültür mRNA ekspresyon bulguları .....	62
4.1.5 A549 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin protein ekspresyon bulguları.....	64
4.2 H1975 Adenokarsinom Hücre Serisi ve AT2 Hücreleri ile Yapılan Deney Bulguları.....	65
4.2.1 AT2 ile H1975 koşullandırılmış besiyeri bulguları .....	65
4.2.2 AT2 ile H1975 hücresi ko-kültür bulguları .....	71
4.2.2.1 AT2 ile H1975 ko-kültürü metabolik aktivite bulguları.....	72
4.2.3 AT2 ile H1975 geçirgen plate ko-kültürü bulguları.....	73
4.2.3.1 AT2 ile H1975 geçirgen plate ko-kültürü metabolik aktivite bulguları.....	75
4.2.4 H1975 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları .....	75
4.2.4.1 H1975 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları .....	75
4.2.4.2 H1975 ile AT2 yapılan ko-kültür mRNA ekspresyon bulguları.....	77
4.2.5 H1975 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin protein ekspresyon bulguları.....	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	81
KAYNAKLAR .....	89
EK Etik Kurul Belgesi .....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	103



## SİMGELER DİZİNİ

°C	Selsius Derecesi
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
Cl <sup>-</sup>	Klor Atomu
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
dH <sub>2</sub> O	Di-iyonize su
g	Merkez kaç kuvveti
gr	Gram
H <sub>2</sub>	Hidrojen
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Karbonik asit
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik asit
HCl	Hidrojen klorür
kD	Kilo dalton
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
N <sub>2</sub>	Azot
Na <sup>+</sup>	Sodyum
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sodyum fosfat dibazik dihidrat (Sodium Phosphate Dibasic Dihydrate)
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz	Sodyum potasyum pompası
NaCl	Sodyum klorür
NO	Nitrik oksit
NO <sub>2</sub>	Nitrojen dioksit
O <sub>2</sub>	Oksijen
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
U	Ünite birimi

## **Kısaltmalar**

APS	Amonyum persülfat
AQP5	Aquaporin-5
AT1	Alveolar epitel tip I hücresi
AT2	Alveolar epitel tip 2 hücresi
ATPaz	Adenozin Trifosfat Proteaz
BSA	Sığır serum albumini (Bovin Serum Albumin)
BS	Dengelenmiş Tuz Solüsyon Tamponu
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CFTR	Kistik fibrosiz transmembran iletkenlik regülatör
DAPK	Ölüm ilişkili protein kinaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNAaz	Deoksiribo Nükleik Asit Proteaz
dNTP	Deoksinükleotitfosfat
EC	Endotel hücreleri (Endotelial Cells)
ECM	Ekstraselüler matris
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ENaK	Epitel Na <sup>+</sup> kanalları
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
FBS	Fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum)
FGF	Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
FLT-1	Fetal karaciğer tirozin kinaz-1
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HIF-1	Hipoksi uyarıcı faktör-1 (Hypoxia-inducible factor-1)
HIF1- $\alpha$	Hipoksi indükleyici faktör1-alfa
ICAM-1	İntraselüler Adezyon Molekül-1

IGFBP-1	İnsulin büyüme faktör bağlayan protein-1;
IL-1 $\beta$	İnterlökin-1beta
IL-8	İnterlökin -8
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
KDA	Kısa devre akımı
KGF	Keratonosit büyüme faktörü
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat (Potassium Dihydrogen Phosphate)
KHAK	Küçük hücreli akciğer karsinom
KHOAK	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinom
KHOAK	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
KV	Kristal Viyole
LLC-PK1	Domuz renal proksimal tübül epitelyum hücreleri
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz (Mitogen-Activated Protein
MCP-1	Monosit kemotaktik protein
miRNA	Mikro RNA
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> /ATPaz	Sodyum potasyum ATPaz
Na <sub>2</sub> EDTA	Disodyum etilendiamin tetraasetik asit
PBS	Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PBST	Tween 20 içeren fosfat tuz tamponu
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor)
PTP	Permeabilite transport porları
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	Retinobalstoma
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species)
SD	Standart Sapma
SDS	Sodyum Dodesilsülfat
SOK	Seçici olmayan katyon
Süp.	Süpernatant

TBE	Tris-borik asit- etilendiamin tetraasetikasit
TEER	Transepitel Elektriksel Rezitans
TGF- $\alpha$	Transföme edici büyüme faktörü-alfa
TMÇ	Tümör mikro çevresi
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör-alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha)
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
YSK	Yüksek seçici katyon
$\alpha$ -ENaK	Alfa-Epitel sodyum kanalı
$\beta$ -ENaK	Beta-Epitel sodyum kanalı
$\gamma$ -ENaK	Gama-Epitel Sodyum kanalı

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Tez amacının şematize edilmesi. ....	4
Şekil 2.1 Akciğerin yapısı .....	6
Şekil 2.2 Bir alveolün yapısı .....	7
Şekil 2.3 Kan hava bariyeri .....	9
Şekil 2.4 AT1 hücresi.....	10
Şekil 2.5 AT2 hücresi.....	12
Şekil 2.6 Alveolar epitelyumda gerçekleşen Na <sup>+</sup> transportu .....	14
Şekil 2.7 $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ENaK alt ünitelerin yapısı .....	15
Şekil 2.8 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz'ın yapısı ve alt üniteleri .....	18
Şekil 2.9 Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması.....	24
Şekil 2.10 Kanser stroması ve elemanları .....	27
Şekil 3.1 Sigara içen ve içmeyen hastalardan alınan sağlıklı doku örnekleri .....	36
Şekil 3.2 Mono-kültürün şematik olarak gösterilmesi .....	38
Şekil 3.3 Ko-kültür ve koşullandırılmış besiyeri deneylerin şematik olarak gösterilmesi.....	40
Şekil 4.1 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi.....	51
Şekil 4.2 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	52
Şekil 4.3 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi .....	52
Şekil 4.4 A549 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	53
Şekil 4.5 A549 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	54
Şekil 4.6 A549 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	55

Şekil 4.7 A549 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>55</b>
Şekil 4.8 A549 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>57</b>
Şekil 4.9 A549 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi.....	<b>57</b>
Şekil 4.10 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri.....	<b>58</b>
Şekil 4.11 A549 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>59</b>
Şekil 4.12 A549 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>59</b>
Şekil 4.13 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri .....	<b>60</b>
Şekil 4.14 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin $\alpha$ -ENaK, $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$ alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri.....	<b>61</b>
Şekil 4.15 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri .....	<b>62</b>
Şekil 4.16 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin $\alpha$ -ENaK, $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$ alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri ....	<b>63</b>
Şekil 4.17 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri.....	<b>64</b>
Şekil 4.18 AT2 ile A549 koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin $\alpha$ -ENaK ve $\alpha$ 1-Na-K/ATPaz protein ekspresyonu .....	<b>65</b>
Şekil 4.19 H1975 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi.....	<b>66</b>
Şekil 4.20 H1975 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>66</b>
Şekil 4.21 H1975 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>67</b>

Şekil 4.22 H1975 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>68</b>
Şekil 4.23 H1975 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>68</b>
Şekil 4.24 H1975 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>69</b>
Şekil 4.25 H1975 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>70</b>
Şekil 4.26 H1975 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>71</b>
Şekil 4.27 H1975 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>72</b>
Şekil 4.28 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri.....	<b>72</b>
Şekil 4.29 H1975 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi .....	<b>74</b>
Şekil 4.30 H1975 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, epitel Na-kanalları (ISC $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi .....	<b>74</b>
Şekil 4.31 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri .....	<b>75</b>
Şekil 4.32 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin $\alpha$ -ENaK, $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$ alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri ....	<b>76</b>
Şekil 4.33 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri .....	<b>77</b>
Şekil 4.34 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin $\alpha$ -ENaK, $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$ alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri .....	<b>78</b>
Şekil 4.35 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri .....	<b>79</b>

Şekil 4.36 AT2 ile H1975 koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin  
 $\alpha$ -ENaK ve  $\alpha$ 1-Na-K/ATPaz protein ekspresyonu ..... **80**



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Akciğer kanser hücrelerinin özellikleri.....	35
Çizelge 3.2 Universal Probe Library'den alınan primer ve primer sekansları.....	46
Çizelge 4.1 A549 koşullandırılmış besiyerinin içerdiği bazı moleküller.....	56
Çizelge 4.2 H1975 koşullandırılmış besiyerinin içerdiği bazı moleküller.....	70

## 1. GİRİŞ

İnsan akciğeri 500 milyon alveolden oluşmaktadır. Bu özel organ, geniş yüzeysel alanı ile hava ve kan arasındaki temasın sürdürülmesi için tasarlanmıştır. Solunum sırasında 120 m<sup>2</sup>'lik bir alan oluşturmaktadır ve bu alan yaklaşık olarak bir tenis kortu büyüklüğündedir. Akciğerdeki gaz alışverişini sağlayan alveolar bariyer epitel ve endotel hücrelerinden oluşmaktadır (Weibel 2009).

Alveolar epitel tip 1 (AT1) epitel hücrelerin sadece 1/3'ünü oluşturmasına rağmen alveolar yüzeyin % 95'ten fazlasını kaplamaktadır. İyon transport sürecine katılan proteinlerin transkripsiyonunu yapar ve düşük metabolik aktivite sergiler. Veziküllerin ve kaveolinlerin tespit edilmesiyle makro moleküllerin taşınmasına dahil olabileceği düşünülmektedir (Wang vd. 2011).

Alveolar epitel tip 2 (AT2) Alveolar yüzeyin küçük bir alanını kaplamasına rağmen (%5), sayıca AT1 hücrelerinden oldukça fazladır. Çok sayıda organel bulunur ve metabolik aktivitesi yüksektir. AT2 hücreleri sentez, sekresyon ve akciğer yüzey komponentlerini geri dönüştürme yeteneğine sahiptir. Yüzey komponentleri lameller cisimcikler aracılığı ile salgılanır ve saklanır. Her AT2 hücresinde 120-180 kadar bu organelden bulunur. Akciğerlerdeki immün defans yanıtından sorumludur ve T hücreleri için indükleyici sinyal oluşturmaktadır. Antijen gibi davranarak immün düzenleyici hücreler olarak görev yaparlar. Akciğer hasarında önemli bir rol oynar ve doku tamir sürecine katılarak hasarlı bölgeye hücrelerin göçü ve çoğalmasından sorumludur (Herzog vd. 2008).

Alveolar reabsorpsiyon sodyum (Na<sup>+</sup>) alımı epitel Na<sup>+</sup> kanalları (ENaK) ile gerçekleşir. Na<sup>+</sup> bazolateral yüzeyden interstisyel alana sodyum potasyum ATPaz'lar (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz) aracılığıyla pompalanır. Bu aktif Na transportu, apikalden bazolateral tarafa doğru ozmotik gradient oluşturur. Bu durum sayesinde sıvı birikimi önlenmektedir (Hollenhorst vd. 2011).

Akciğer kanseri, agresif seyreden bir kanser türüdür ve dünyada en yaygın 3. kanser tipidir (Beasley vd 2005). Kanser ilişkili ölüm oranında ilk sıradadır. Sadece ABD`de yılda 160.000 kişinin ölümüne neden olmaktadır. Sınıflandırılması histolojik değerlendirmeyle yapılır ve elliden fazla farklı histolojik varyansı vardır. Bu varyanslar farklı genetik, biyolojik ve klinik özelliklere sahiptir. Tedaviye cevapta optimum başarı elde edilmesi için doğru sınıflandırmanın yapılması önemlidir (Rogli vd. 1985).

Akciğer kanserinin temel 2 alt türü vardır.

- Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)
- Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHOAK)

KHOAK ise kendi arasında adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom diye ayrılır (Maitra ve Kumar2007).

Solunum yolları mukozasının karsinojen etkenlerle uzun süre karşılaşması sonucunda dokularda bir takım değişiklikler olur. Karsinojenler hücre içinde protein, lipid gibi birçok moleküle ve DNA'ya bağlanır. Akciğer kanser türlerinde en sık rastlanılan işlevsel değişiklikler ya da mutasyonlar p53, Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), K-RAS ve Retinoblastoma (Rb)`dir. (Fong vd. 2003, Herbst vd. 2008)

Adenokarsinom; KHOAK türlerinin en yaygın tipidir ve ABD`de KHOAK`ların % 40`ını oluşturmaktadır. Adenokarsinomlar diğer akciğer kanser tipleri gibi sigara içimi ile ilgili olmalarına rağmen özellikle hiç sigara içmemiş akciğer kanseri hastalarında da görülür (Bryant ve Cerfolio 2007). Bu kanser tipine Skuamöz ve küçük hücreli akciğer kanserinin aksine genellikle akciğer periferinde rastlanılır. Bu duruma sigara içerken filtre kullanımının neden olduğu düşünülmektedir. Sigara içiminin tümörle ilişkisi diğer tiplere göre daha az olmakla birlikte, son yıllarda düşük katranlı sigaraların daha derin aspirasyonu ile oluşan etkinin bu tip tümörlerin artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Sigara içmeyen kadınlarda adenokarsinom daha sık görülmektedir (Subramanian ve Govindan 2007).

Akciğer adenokarsinomun genetik profilini araştıran bir çalışmada p16 ve Rb1 genlerindeki kopya sayısında değişikler bildirilmiştir (Tonon vd. 2005). Akciğer adenokarsinomlarda rastlanılan mutasyonlar % 50-70 oranı ile en fazla p53'de görülmektedir (Kadara vd. 2012). Yine primer KHOAK türlerinde yapılan bir çalışmada Rb ve p16 protein ekspresyon kaybı ve p53 protein ekspresyon artışı rapor edilmiştir (Geradts vd. 1999).

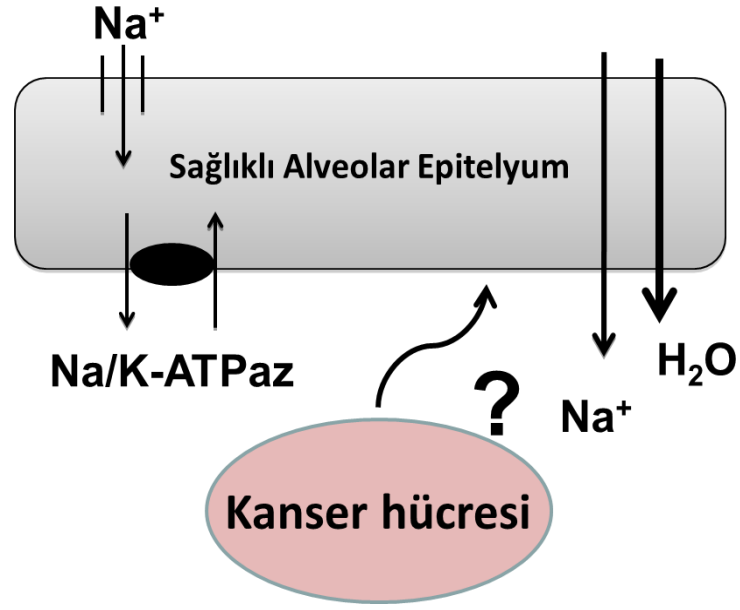
Tümörün etrafındaki hücrelerden oluşan bir tümör mikro evresi (TM) vardır. Bu evre kan damarları, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, diğer hücreler, sinyal molekülleri, ekstraselüler matris ve tümör dahil olmak üzere var olan hücresel bir ortamdır. Tümörü saran hücreler kanser stromasını oluşurmaktadır. Bu hücrelerin hiçbiri kendi başına malign hücre değildir ancak TM'de birbirleriyle ve kanser hücresiyle direkt ya da indirekt etkileşim sonucu anormal fenotip kazanırlar ve fonksiyonları değişmektedir (Li vd. 2007). Tümör, çevresindeki mikro ortam ile yakından ilişkilidir ve sürekli etkileşim halindedir. Tümörler, ekstraselüler sinyaller salgılayarak, tümör angiogenezi başlatarak ve periferik immm tolreransı indükleyerek TM'i etkileyebilmektedir (Witz ve Levy-Nissenbaum 2006).

Kanserizasyon alan etkisi hakkında yapılan araştırmalar kanser hücrelerinin, etrafını saran hücreler ile etkileşim halinde olduklarını ve onları modifiye edebildiklerini göstermektedir.

- Bu kanserli dokuyu çevreleyen hücreler histolojik açıdan sağlıklı gözükmektedir.
- Kanser hücreleri bu çevreleyen hücrelerin gen ifadesini değiştirebilmektedir.

Çeşitli mekanizmalar sağlıklı doku üzerinde etkili olabilmektedir. Normal görülen hücrelerde genetik ve epigenetik değişimler rapor edilmiştir (Steiling 2008, Gomperts vd. 2011). Bunlardan bazıları tümör supresör olarak görev yapan, p16 ve p53'tr. Bu genlerde veya gen ürünlerinde fonksiyon değişiklikleri, hiper-metilasyon ve mutasyon olduğu belirtilmiştir (Kadara ve Wistuba 2012).

Bu çalışmada tümör mikro çevresi ve kanserizasyon alan etkisi kavramları ışığında akciğer adenokarsinom kanser hücrelerinin, onları çevreleyen sağlıklı akciğer epitel hücrelerinin  $\text{Na}^+$  iyon transportunu fonksiyonel olarak nasıl etkilediğinin araştırılması amaçlanmıştır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Tez amacının şematize edilmesi

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Akciğerler

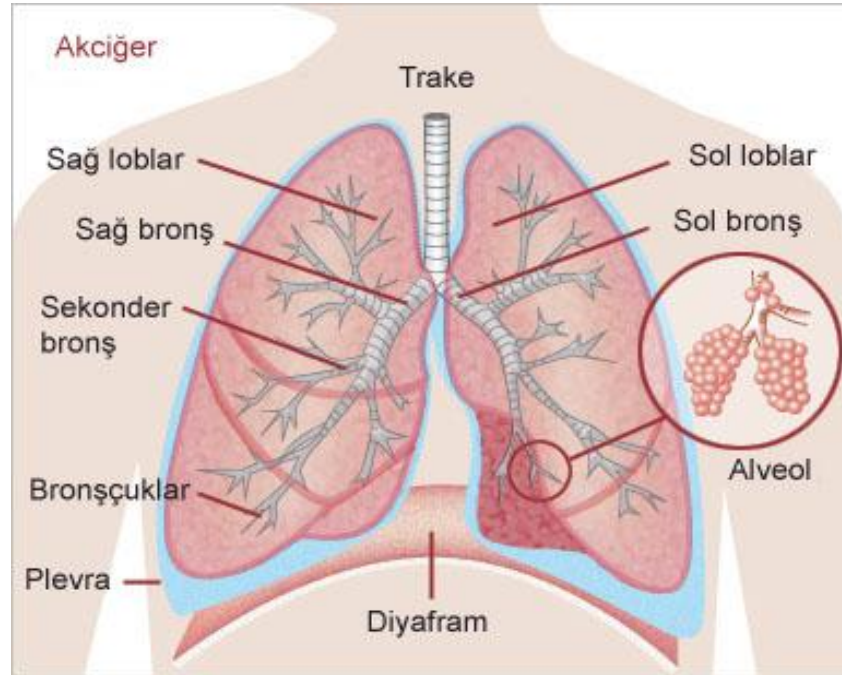
Akciğerler toraks boşluğu içinde yerleşmiş, inspirasyon havası ile kan arasındaki gaz değişiminin yapıldığı asıl solunum organlarıdır. Göğüs boşluğu içinde yer alır ve kalple birlikte göğüs boşluğunu doldurur. Akciğerler; sağ akciğer 3, sol akciğer 2 olmak üzere toplam 5 lobtan oluşur. Sol akciğerin küçük olmasının nedeni, kalbin buraya yakın oluşudur. Akciğerler yaklaşık olarak 2,400 km hava yolu ve 300 ila 500 milyon alveolden oluşur. Göğüs ve karın boşluğunu ayıran diyafram denilen zarın üzerinde bulunmaktadır.

Akciğerlerin üzeri plevra denilen çift katlı bir zarla çevrilidir. Damar, sinir ve bronşların akciğere girdiği yerde plevra zarı yoktur. Her akciğerin ayrı bir plevrası vardır. Plevranın dış katı göğüs çeperine yapışmıştır. Bu kat parietal yapıda olduğundan parietal plevra adını alır. Plevranın diğer katı akciğerlerin yüzeyini örter. Buna da viseral veya pulmonal plevra denir. Bu iki yaprak ayrı olmayıp akciğerlerin hilus kısmında birbirleriyle birleşirler. Ayrıca bu iki yaprak iç içe olduğundan birbirleriyle sıkı temas halinde olup aralarında plevra boşluğu bulunur. Her akciğerin ayrı bir plevrası olduğundan aynı şekilde her bir akciğerin etrafında ayrı bir plevra boşluğu bulunur. Bu boşlukta akciğerlerin hareketini kolaylaştıran bir sıvı vardır.

Akciğerlerin her bir lopu altıgen piramit şeklinde  $1\text{cm}^3$  hacminde küçük lopcuklara ayrılmıştır. Lopcukların bazıları akciğerin yüzeyinde, bazıları ise derinliğindedir. Yüzeyde olanlar piramit şeklinde olup tabanları akciğerlerin yüzeyinde çok köşeli olarak görülür. Tepeleri ise hilusa doğrudur. Derinde olan lopcukların şekilleri değişiktir. Her bir lopcuk küçük ve başlı başına bir akciğerciktir.

Lopcuklar üzüm salkımına benzeyen hava keselerine (acinus) ayrılmışlardır. Hava keseleri de ampül şeklinde keseciklere ayrılmıştır. Bütün lopcuklar birbiri üzerine düzensiz bir şekilde yığılmışlardır. Yalnız bunları birbirinden ayıran esnek bir katılğan

doku mevcuttur. Yani, her lopcuk kan damarları ve bronşların kolları ile sinirlerden yapılı katılğan bir doku ile çevrilidir. Lopcukların içeresine giren bronş kolları 50-60 kadar küçük kollara ayrılır. Bronşlar, kıkırdak iskelet, elâstik bağ dokusu ve düz kaslardan meydana gelir. Sağ ve sol akciğerin içine girmesine göre sağ bronş, sol bronş adını alır. İçeri epitel hücreleri ile örtülmüştür. Mukoza içeresinde salgı veren bezler vardır. Bronşlar, akciğerlerin içinde bronşcuklarla devam eder. Bronşcukların yapısı da bronşlarda olduğu gibidir. Bronşcuklar muntazam olmayan boşluklara açılırlar. Bu boşluklardan, 3 mm uzunluğunda 40 mikron genişliğinde birçok kanal çıkar. Bu kanalların çeperleri girintili çıkıntılıdır. Burada hem birbirine hem de kanal boşluğuna açılan bir takım keseciklerin çapları 0,2-0,3 mm sayıları da 500 milyon kadardır. Alveollerin çeperleri yalın tek kat epitelten yapılmıştır ve kılcak kan damarları ile çevrilidir. Oksijen (O<sub>2</sub>) ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) değişimi alveollerde gerçekleşir. Alveole giren havadaki O<sub>2</sub> kılcak kan damarlarına geçer. Kirli kandaki CO<sub>2</sub> de yine alveollerde tutularak dışarı verilir. Buna hücre dışı solunum denir. Alveollerin toplam yüzeyi 48 m<sup>2</sup> dir. İçerleri hava ile doludur. Kılcak damarların bu kesecikler etrafındaki toplam yüzeyi ise 150 m<sup>2</sup> kadardır (Şekil 2.1) (Walter ve Boulpaep 2004, Weinberger vd. 2008).



Şekil 2.1 Akciğerin yapısı (www.abc.net.au 2015a)

### 2.1.1 Alveoller

Alveoller respiratuvar branşiyoller, alveol kanalları ve alveol keselerinde bulunan yaklaşık 200 mikrometre çapında kese şeklindeki çıkıntılardır. Akciğerlerin süngerimsi yapısını sağlayan alveoller, bronş ağacının son bölümleridir. Yapısal olarak alveoller arı kovanında bulunan petekler gibi tek tarafı açık küçük ceplere benzer. Bu kadeh biçimindeki yapılarda hava ile kan arasında  $O_2$  ve  $CO_2$  değişimi gerçekleşir. Alveol duvarının yapısı, dış ve iç ortam arasında difüzyonu arttıracak şekilde özelleşmiştir. Genelde her duvar iki komşu alveol arasında yer alır ve bu nedenle **interalveoler septum** ya da **duvar** olarak isimlendirilir. Bir alveol septumu, arasında kapillerler, fibroblastlar, elastik ve retiküler lifler ile makrofajlar bulunan iki ince yassı epitel tabakasından oluşur. Kapillerler ile bağ dokusu matriksi **interstisyumu** oluşturur. Alveol septumunun interstisyumunda organizmanın en zengin kapiler ağı yer alır (Şekil 2.2) (Junqueira vd. 1998).



Şekil 2.2 Bir alveolün yapısı (www.shutterstock.com 2015b)



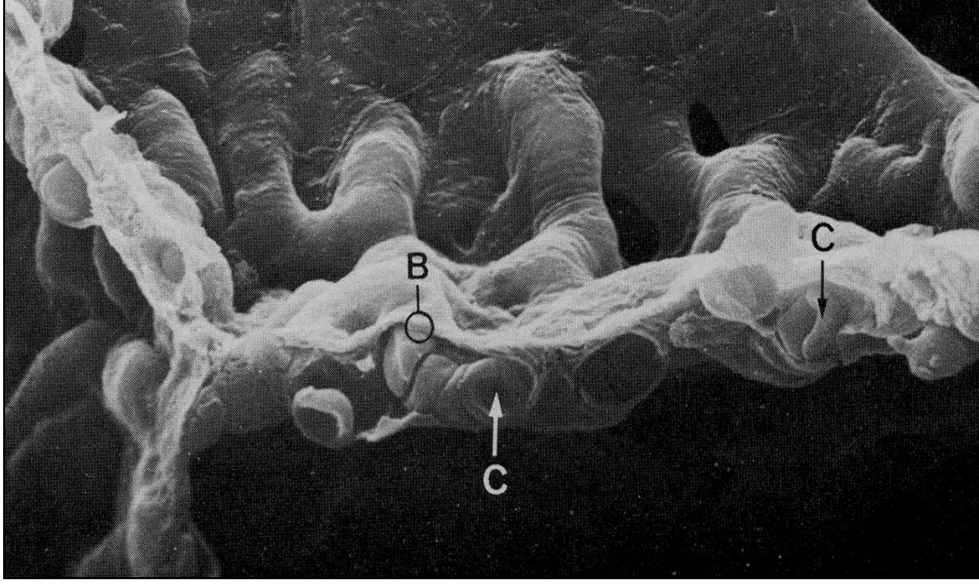
### 2.1.2 Kan-hava bariyeri

Alveollerdeki hava ile kapiler kanı üç komponentten oluşan bir **kan-hava bariyeri** ile birbirinden ayrılmıştır. Bu komponentler: alveollerin yüzey epiteli ve alveol hücrelerin sitoplazması; birbirine çok yakın konumdaki alveol ve endotel hücrelerinin kaynaşmış bazal laminası ve endotel hücrelerinin sitoplazmasıdır. Bu tabakaların toplam kalınlığı 0,1-1,5 mikrometre arasında değişir. İnteralveolar septum içinde anastomozlar yapan pulmoner kapilerler, retiküler ve elastik liflerin oluşturduğu bir ağla desteklenir. Alveol duvarının daralıp genişlemesine uygun bir biçimde düzenlenmiş bu lifler alveollerin temel yapısal desteğidir. Septumun interstisyumunda bazal membran, lökositler, makrofajlar ve fibroblastlar da bulunur. Alveol duvarının epitel hücreleri ile endotel hücreleri tarafından üretilen iki bazal lamina kaynaşarak bazal membranı oluşturur (Ovalle ve Nahirney 2009).

Alveoller içindeki havadan gelen O<sub>2</sub> kapilerler içindeki kana bu tabakaları geçerek ulaşır. CO<sub>2</sub> difüzyonu ise ters yönde gerçekleşir. CO<sub>2</sub>'nin H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'den ayrılması eritrositlerde bulunan karbonik anhidraz enzimi ile katalizlenir. Akciğerlerde bulunan yaklaşık 500 milyon alveol akciğerlerin iç değişim yüzeyini önemli ölçüde artırır. Bu yüzeyin yaklaşık 140 m<sup>2</sup> olduğu hesaplanmıştır.

İnteralveoler septumda başlıca beş tip hücre bulunur: kapiler endotel hücreleri (%30); AT1 hücreleri (% 8), AT2 hücreler (%16), fibroblast ve mast hücrelerini kapsayan interstisyel hücreler (%36) ve alveoler makrofajlar (%10).

Kapilerlerin endotel hücreleri çok incedir ve kolaylıkla AT1 hücreleri ile karıştırılabilir. Kapilerlerin endoteli pencereci değildir ve kesintisiz olarak kapilerleri döşer. Nükleus ve diğer organellerin bir araya toplanması, hücrelerin geri kalan bölümünün gaz değişimini kolaylaştırmak için ileri derecede incelmeye olanak verir. Hücrenin yassılaştırmış kısmının sitoplazmasında görülen en belirgin özellik çok sayıda bulunan pinositotik veziküllerdir (Junqueira vd. 1998) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Kan hava bariyeri (Burri vd. 2005)

(B: bariyer, C: kapiller)

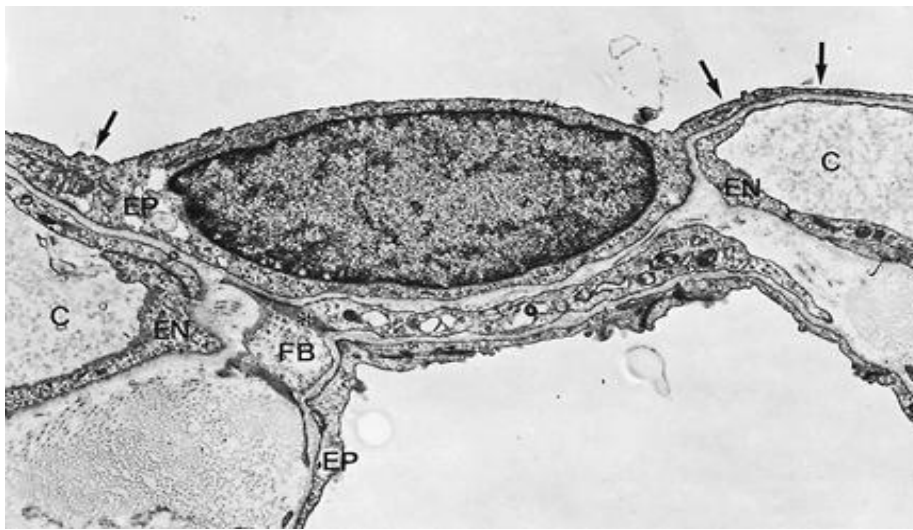
### 2.1.3 Alveolar pnömosit hücreleri

#### 2.1.3.1 Alveolar tip I hücreler (AT1)

**Yassı alveol hücreleri** olarak da isimlendirilen alveol yüzeyini döşeyen Alveolar Tip I hücreler (AT1) ileri derecede incelmış hücrelerdir. Tip I hücreler alveol yüzeyinin % 95' ini kaplar (geri kalan %5'lük yüzey tip II hücrelerce kaplanır) (Gil vd. 1981). Sıklıkla küçük alveolar hücre olarak adlandırılan AT1 hücresi alveolar septumda bulunan en büyük hücredir; ortalama hacmi sıçanlarda yaklaşık olarak  $900 \mu\text{m}^3$  ve insanlarda  $1800 \mu\text{m}^3$  tür ve  $5100 \mu\text{m}^2$ 'lik bir alan kaplar. Küçük bir çekirdek, birkaç küçük mitokondri, ribozomlu birkaç endoplazmik retikulum sistemi ve pek göze çarpmayan golgi cisimciği içeren nispeten basit ve polarize olan hücrelerdir. Ayrıca aralara serpilmiş mikrofilmanetler de gözlemlenir (Schneeberger 1991). Golgi kompleksi, endoplazma retikulumu ve mitokondri gibi organeller nükleus çevresinde kümelenirler ve organellerden tamamen yoksun geniş sitoplazma alanları sağlarlar. İnce kısmın sitoplazmasında, sürfaktan dönüşümünde ve yüzeyin küçük partiküllerden temizlenmesinde rol oynayabilen çok miktarda pinositotik veziküller bulunur. AT1

hücreleri iyon transport sürecine katılan proteinlerin transkripsiyonunu yapar ve düşük metabolik aktivite sergiler. Veziküllerin ve kaveolinlerin tespit edilmesiyle makro moleküllerin taşınmasına AT1 hücrelerinin de dâhil olduğu düşünülmektedir (Wang vd. 2011).

AT1 hücreleri, ince bir gaz geçirgen membran olarak fonksiyon görmek için son derece evrimleşmesine rağmen istikrarsız bir ömür sürerler. Çünkü AT1 hücreleri bölünemeyen, son derece farklılaşmış hücrelerdir. Bütün AT1 hücrelerinde desmozomların yanı sıra, doku sıvısının alveol hava boşluğuna sızmasını önleyen zonula okludensler bulunur. Bu hücrelerin başlıca görevi gazların geçişine uygun minimal kalınlıkta bir bariyer sağlamaktır. Hem solunan hem de parenteral olarak uygulanan birçok ajanın alveolar epitele hasar verdiği bilinir. Bunların birkaçı NO<sub>2</sub>, ozon, *Pneumocystis carinii*, bleomisin, siklofosamid ve volkanik kül gibi çeşitli (değişik) ajanları içerir. Alveoller hasara karşı en hassas hücreler, AT1 hücreleridir. Bunun sebebi kısmen mitozun ve hücre tamirinin yetersizliğidir. Letal hasarın bir sonucu olarak, bu hücreler arkalarında çıplaklaşmış bazal membran bırakarak koparlar. AT1 hücrelerin kaybına karşılık olarak, yavru hücrelerin yeni AT1 hücrelerine farklılaşmasını takiben AT2 hücrelerin mitotik aktivitesinde bir artış vardır. Bu aktivite sayesinde çıplaklaşmış yüzeyler yeniden doldurulur (Schneeberger 1991) (Şekil 2.4).



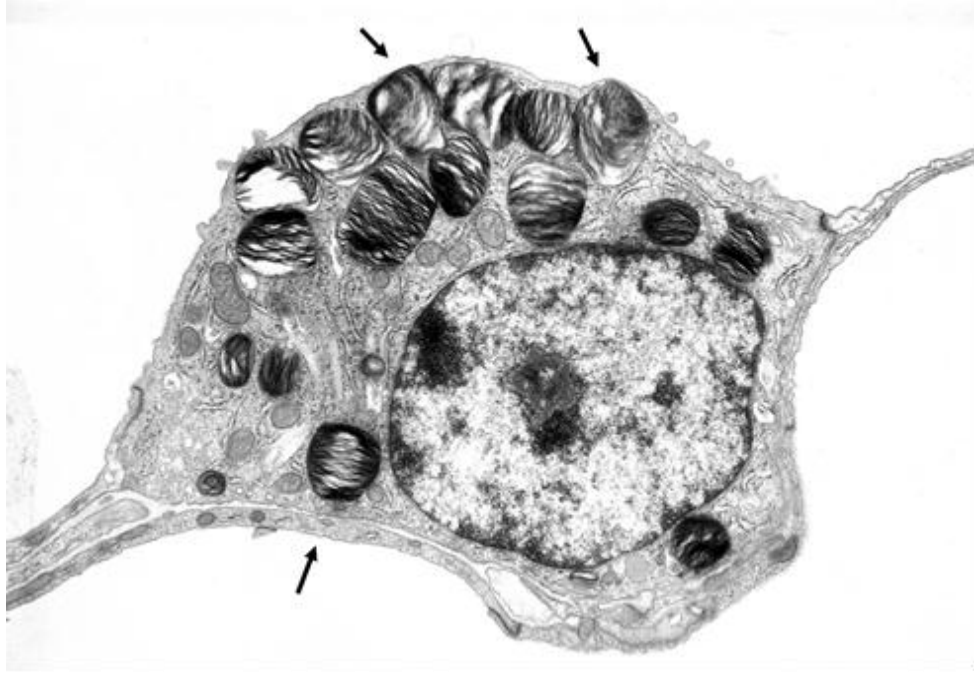
Şekil 2.4 AT1 hücresi (Burri vd. 2005)

(C: kapiller, EN: endotel hücre, EP:AT1 hücre, oklar:AT1 hücresinin ince sitoplazmik uzantısı)

### 2.1.3.2 Alveolar tip II hücreler (AT2)

AT2 hücrelerine **septal hücreler** de denir ve AT1 hücreleri arasına serpilmiş olarak bulunurlar. AT1 hücreler ile aralarında desmozomlar ve zonula okludensler vardır. AT2 hücreler kabaca kübik hücrelerdir ve genellikle alveollerin birleştikleri ve birbirleriyle açılar oluşturdukları noktalarda iki ya da üç hücreden oluşan gruplar halinde bulunurlar. Bazal membran üzerine oturan bu hücreler, alveol duvarını döşeyen AT1 hücrelerle aynı orjinli olup epitelin bir parçasını oluşturur. AT2 hücreleri, tipik salgı hücrelerine benzer (Ovalle ve Nahirney 2009). AT2 hücresi de AT1 hücresi gibi polarize olan hücrelerdir. Apikal ve bazolateral alanları olacak şekilde AT2 hücre membranı bölünür. Membran alanları adezyon molekülleri ile lateral hücre yüzeyinde ayrı tutulur. Apikal hücre yüzeyinde çok sayıda kısa mikrovilli vardır ve bazen bu mikrovilliler AT2 hücre tanımlanmasında kullanılır (Tsilibary ve Williams 1983).

Mitokondrileri, kaba endoplazma retikulumları, iyi gelişmiş bir golgi kompleksleri ve serbest apikal yüzlerinde mikrovillusları vardır. Sitoplazmaları karakteristik veziküler ya da köpüksü bir görüntü sergiler. Bu veziküler, **lameller cisimcikler** tarafından oluşturulur. Ortalama 1-2 mikrometre çapında olan ve konsentrik ya da birbirine paralel lameller içeren bu yapılar ünit membranla sarılıdır (Şekil 2.5). Fosfolipitler, glikozaminoglikanlar, alfa-glukosidaz ve sürfaktan protein-A gibi belirli lizozomal enzimleri ve proteinler içeren lameller cisimcikler, hücrelerde sürekli sentez edilip apikal yüzden salgılanır (Mason ve Williams 1991). Yüzey komponentleri lameller cisimcikler aracılığı ile salgılanır ve saklanır. Her AT2 hücre içerisinde rastgele dağılmış halde 120-180 kadar bu organelden bulunur (Herzog vd. 2008).



Şekil 2.5 AT2 hücresi (www.melss.med.mun.ca 2015c)

(oklar: lameller cisimcikleri)

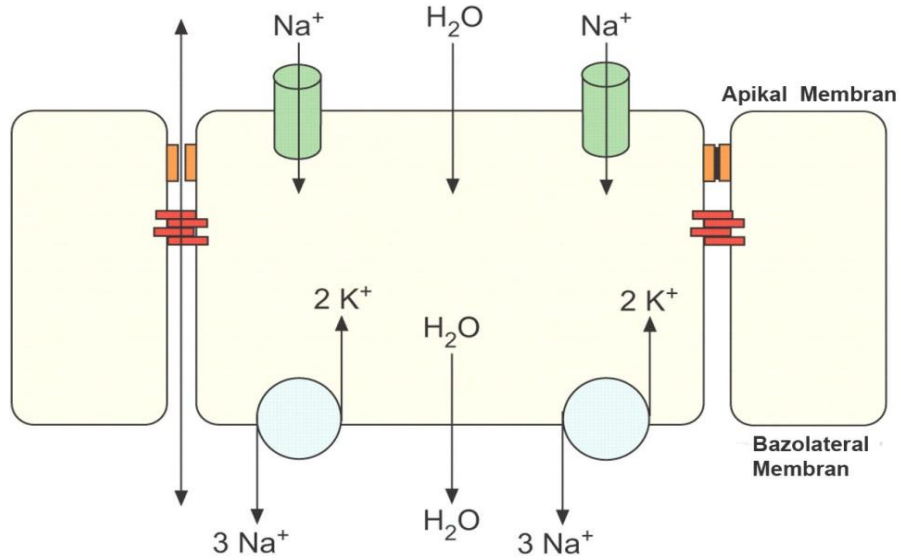
Bu lameller cisimcikler ayrıca alveol yüzeyine yayılarak ekstraselüler bir alveol örtüsü oluşturan ve yüzey gerilimini düşüren **pulmoner sürfaktanı** oluştururlar. Pulmoner sürfaktanın akciğerde birkaç önemli işlevi vardır. Alveol hücrelerinin yüzey geriliminin azaltılmasına yardımcı olur. Alveollerin çapları küçüldükçe yüzey geriliminin kollabe edici etkisi artar. Alveolar çap küçüldükçe, alveolü genişlemiş durumda tutmak için gereken basınç artar. Yüzey geriliminin azaltılmasının anlamı, alveollerin havayla dolması için daha az solunum gücü harcanması ve böylece solunumun kolaylaştırılmasıdır. Sürfaktan, alveolleri stabilize edici etkisi ile alveoller küçüldükçe, yüzeydeki sürfaktan yoğunluğu artarak, yüzey gerilimini azaltır. Alveol genişledikçe yüzeyindeki sürfaktan tabakası incelerek, yüzey gerilimi büyür. Bu etki, akciğerlerin her yerinde alveol çapının hemen hemen aynı olmasını sağlar. Ayrıca sürfaktanın, alveollerde ödem sıvısı birikimini önleyici rolü vardır (Junqueira vd. 1998).

AT2 hücreleri sentez, sekresyon ve akciğer yüzey komponentlerini geri dönüştürme yeteneğine sahiptir. Akciğerlerdeki immün defans yanıtından sorumludur. T hücreleri için indükleyici signal oluşturur. Antijen gibi davranarak immün düzenleyici hücreler olarak

görev yaparlar. Apikal yüzeyden bazolateral yüzeye  $\text{Na}^+$  transepitel transportu sayesinde alveolar sıvıyı en aza indirger. Akciğer hasarında önemli bir rol oynar. Doku tamir sürecine katılarak hasarlı bölgeye hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonundan sorumludur (Herzog vd. 2008). Epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- $\alpha$ ), insülin, kolera toksini, makrofaj tarafından salgılanan faktörler AT2 hücre proliferasyonunu stimüle eder (Mason ve Williams 1991).

## **2.2 Alveolar Reabsorbsiyon**

Otuz yıl öncesine kadar su ve tuz transportunun alveolar ve uzak havayolu epitelyumda nasıl düzenlendiği bilinmezken ilk olarak 1982 yılında yapılan çalışmalarla akciğerdeki sıvı dengesinin aktif iyon transport mekanizmaları ile nasıl düzenlendiği kanıtlanmıştır (Goodman ve Crandall 1982, Mason vd. 1982). Yapılan çalışmalar izole edilmesi kolay olan AT2 hücresi üzerinde yoğunlaşmıştır. AT2 hücreleri sürfaktan salgılanmasından ve  $\text{Na}^+$ 'nin apikal yüzeyden bazolateral yüzey vektörel transportundan sorumludur. Alveolar reabsorbsiyon  $\text{Na}^+$  transportu ile gerçekleşir.  $\text{Na}^+$  alımı amiloride duyarlı ve amiloride duyarsız kanallar vasıtasıyla apikal yüzeyden olur ve ardından  $\text{Na}^+$  bazolateral yüzeyden  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aracılığıyla akciğer interstitiuma doğru pompalanır. Devam eden pompalama işleminden dolayı,  $\text{Na}^+$  kimyasal potansiyeli hücre içinde düşüktür. Hücre içine giriş pasif yolla olur ve sonra  $\text{Na}^+$  özelleşmiş yolaklar kullanarak aşağıya doğru akarken kimyasal potansiyel gradient oluşturur. Bu durumda bazolateral transport, gradiente karşı iyonları hareket ettirmek için enerjiye gerek duyar (Şekil 2.6) (Matthay vd 2002).



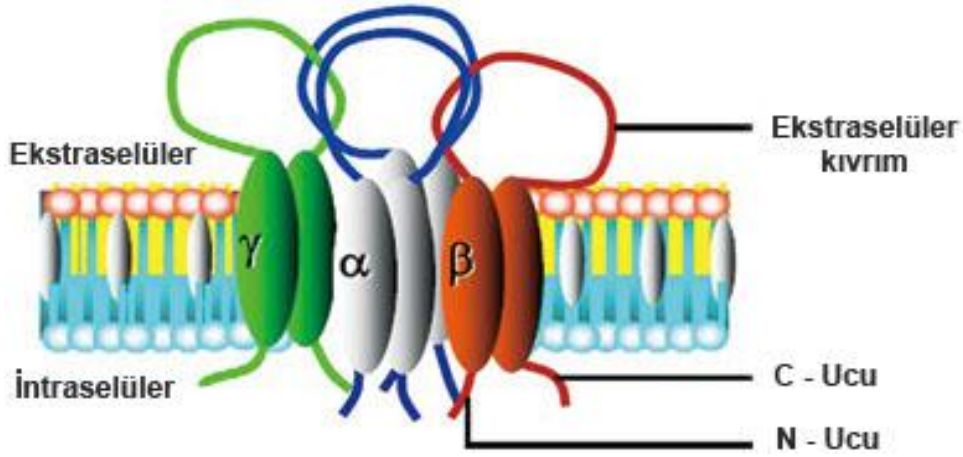
Şekil 2.6 Alveolar epitelyumda gerçekleşen  $\text{Na}^+$  transportu (Zhou vd. 2008)

$\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ /ATPaz ATP'nin hidrolizi ile yakılan konsantrasyon gradientlerine karşı hücre içine  $\text{K}^+$  ve hücre dışına  $\text{Na}^+$  pompalayarak transmembran gradientlerini devam ettiren ve yaygın bir plazma membran iyon taşıyıcı olan ATPazdır. Aktif  $\text{Na}^+$  transportu alveolar epitelyumdan geçerken osmotik güç oluşturur ve bu durum alveolar sıvının reabsorbsiyonuna yardım eder. Alveolar reabsorbsiyon sağlanmadığı takdirde alveolar boşlukta ödem oluşur. Hava boşluklarından ödem sıvısının çıkarılması epitel hücrelerinin karşı kutuplarındaki kanallar ve sodyum pompalarının polar dağılımı ile gerçekleştirilir (Borok vd. 1996).

AT1 hücresinde bulunan aquaporin-5 sayesinde yüksek osmotik su geçirgenlik kapasitesine sahiptir (Dobbs vd. 1998). Ayrıca  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ /ATPaz'ın iki alt ünitesinin  $\alpha 1$ - ve  $\alpha 2$ - sığın AT1 hücresinde bulunduğu rapor edilmiştir (Ridge vd. 1997). Helms ve arkadaşları ilk defa  $\text{Na}^+$  transport özelliklerini AT1 ve AT2 canlı akciğer dokusunda değerlendirmiştir (Helms vd. 2008). Yukarıda bahsedilen çalışmalar ve benzeri birçok çalışma AT2 hücreleri vektörel  $\text{Na}^+$  transportundan primer olarak sorumlu hücreler olmasına rağmen AT1 hücrelerinde reabsorbsiyonda önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Johnson vd. 2002, Matthay 2014).

### 2.2.1 Epitel sodyum ( $\text{Na}^+$ ) kanalları (ENaK)

Northern blot gibi in situ hibridizasyon çalışmaları hem in vivo hem de in vitroda AT2 hücrelerinde ENaK'ın üç alt ünitesi ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ) için mRNA'nın varlığını saptamıştır. (McDonald vd. 1994, Matsushita vd. 1996). Üç alt ünite de aynı yapıya sahiptir. ENaK alt ünitelerinde iki hidrofobik membran uzatan bölge, intraselüler amino ve karboksil ucu, iki transmembran uzatan alan ve sisteince zengin büyük ekstraselüler kısım (loop) bulunur (Şekil 2.7) (Sun vd. 2011).



Şekil 2.7  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  ENaK alt ünitelerinin yapısı (Sun vd. 2011)

*Xenopus* oosit çalışmaları amiloride duyarlı  $\text{Na}^+$  transportunun,  $\alpha$ -ENaK alt ünitesine  $\beta$ -ENaK ya da  $\gamma$ -ENaK alt ünitelerinden daha fazla bağımlı olduğunu göstermektedir (Canessa vd. 1994, McNicholas ve Canessa 1997). Ayrıca  $\alpha$ -ENaK ile  $\beta$ -ENaK ya da  $\alpha$ -ENaK ile  $\gamma$ -ENaK ko-enjeksiyon yapıldığında  $\text{Na}^+$  transportu yaklaşık olarak 5 katı kadar artmaktadır. Üç alt ünite beraber eksprese edildiğinde yüksek seçici katyon (YSK) kanalının beklenen özelliklerini üretmektedir. A549 hücrelerinde deksametazon  $\beta$ -ENaK ya da  $\gamma$ -ENaK ekspresyonunu arttırmaktadır (Lazrak vd. 2000a). ENaK alt ünitelerinin alveolar reabsorpsiyon için hayati öneme sahip olduğu inaktif edilen ENaK alt üniteleri olan knockout fare deneylerinde ortaya konulmuştur.  $\alpha$ -ENaK'ı inaktif edilen fare solunum darlığı sendromu geliştirmiştir ve doğumdan 40 saat sonra ölmüştür. Doğum sonrası akciğerlerindeki sıvıyı reabsorbe edemedikleri için deney



farelerin ölümü ile sonuçlanmıştır (Hummler vd 1996).  $\beta$ -ENaK ya da  $\gamma$ -ENaK inaktif knockout fareler doğumdan sonra sıvı absorpsiyonunu yapabilmelerine karşın doğal tip farelerden daha uzun sürede sıvı absorpsiyonu yapmışlardır. Fakat böbreklerde anormal elektrot reabsorpsiyonu nedeniyle ölümcül hiperkalemiya gelişmiştir ve bu nedenle fareler ölmüştür (Barker vd. 1998, McDonald vd. 1999). Bu çalışmalar,  $\alpha\beta$ -ENaK ya da  $\alpha\gamma$ - ENaK alt ünitelerin beraber aktif olmasının solunum fonksiyonları için yeterli olduğunu ama böbreklerde  $\text{Na}^+$  absorpsiyonu için yetersiz kaldığını göstermektedir.

Jain ve arkadaşların yaptığı çalışmalarda, YSK kanalının  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ - ENaK ve  $\gamma$ -ENaK alt ünitelerinden oluştuğunu ve seçici olmayan katyon (SOK) kanalının ise sadece  $\alpha$ -ENaK alt ünitesinin oluşturduğu bildirilmiştir (Jain vd. 1999, Jain vd. 2001). Amiloride duyarlı sodyum kanallarındaki çeşitlilik, ENAK'ların farklı alt ünitelerin kombinasyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bu alt üniteler çevresel koşullara bağlı olarak kanalda toplanmaktadır. Hipoksi, streoidin azalması ya da geçirgen olmayan matriks gibi durumlarda sadece  $\alpha$ -ENaK oluşan SOK kanalı aktifleşirken normoksiya, streoide doygunluk ve geçirgen matriks durumlarında ise  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ - ENaK ve  $\gamma$ -ENaK alt ünitelerin toplanmasıyla YSK kanalı aktifleşmektedir (Eaton vd. 2004).

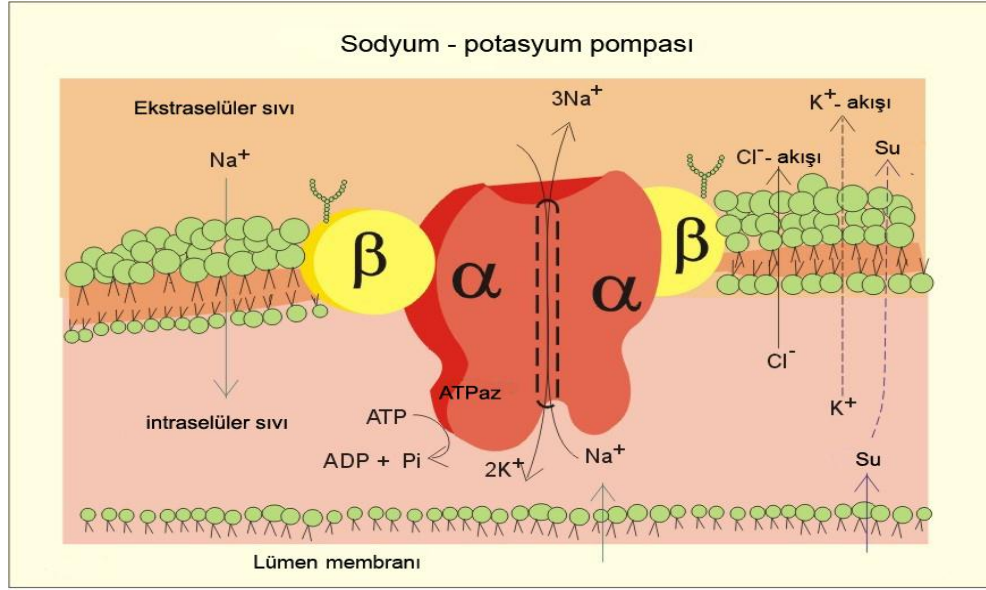
Yapılan birçok çalışma,  $\text{Na}^+$  transportunu alveolar epitel hücrelerinde  $\beta_2$ -agonist aracılığı ile arttırıldığı yönündedir (Berthiaume vd. 1989, Chen vd. 2002). Terbutalin gibi  $\beta_2$ -agonist ya da CPT-cAMP gibi cAMP analogları alveolar epitel hücrelerinde  $\text{Na}^+$  transportunu arttırmaktadır. AT2 hücrelerinde,  $\beta_2$  reseptörlerin adenilat siklaz ile stimüle edilmesi intaselüler cAMP seviyesini arttırmaktadır ve cAMP bir yandan  $\text{Na}^+$  transportunu aktive ederken diğer yandan da kistik fibrosiz transmembran iletkenlik regülatör tipi (CFTR) klor ( $\text{Cl}^-$ ) kanalını aktive etmektedir (Garty 1994, Jiang vd. 1998).

### **2.2.2 Sodyum potasyum pompası ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz enzimi)**

Sodyum potasyum pompası ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz enzimi) ATP'nin hidrolizi ile yakılan ilgili konsantrasyon gradientlere karşı hücre içine  $\text{K}^+$  ve hücre dışına  $\text{Na}^+$  pompalayarak

plazma membranı boyunca elektrokimyasal  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  gradientleri devam ettiren yaygın bir plazma membran iyon taşıyıcı ATPaz'dır. Alveolar epiteli de içeren epitelin çoğunda  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz hücrelerin bazolateral kısmı ile sınırlı tutulur; bu polarize dağılım suyun transportu tarafından osmotik olarak takip edilen sodyumun vektoryal transportu için esastır.

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz, genellikle bir dokuya özgü modelde eksprese edilen her bir alt ünitesinin multipl izoformlarının olmasına rağmen 1:1 oranında bulunan bir alfa  $\alpha$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitesi ve bir beta  $\beta$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitesinden oluşan heterodimerik bir transmembran proteindir.  $\alpha 1$ - izoformu sodyum ve potasyumun hareketlerini katalizler ve spesifik inhibitör ouabain'i bağlar (Şekil 2.8) (Skou 1998).  $\alpha 1$ - izoformu, AT2 hücrelerinde baskın formdur fakat kültürü yapılmış AT1 de  $\alpha 2$ ' yi eksprese edebilir (Ridge vd 1997).  $\beta$ - alt ünitesi 3 adet izoforma sahiptir ve plazma membranına toplanmış molekülleri hedef almaktadır.  $\alpha 1$ - ve  $\beta 1$ - alt ünitelerinden oluşan heterodimerik formun alveolar epitel hücrelerde baskın  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz izoformu olduğuna inanılmaktadır. Hem  $\alpha$ - hem de  $\beta$ - izoformlarının membranda  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın fonksiyonel insersiyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (McDonough vd. 1990). Alveolar epitelyumda  $\beta 1$ - alt ünitesi'nin adenoviral gen transferi yetişkin sıçanlarda (Factor vd. 1998) ve fetal AT2 hücrelerinin bitişik monotabakalarında (Thome vd. 2001)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz ekspresyonunu ve sıvı klirensini arttırmaktadır. Hava yollarından ödem sıvısının uzaklaştırılması epitel hücrelerinin zıt kutuplarındaki kanallar ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın polar dağılımı ile gerçekleşmektedir (Goodman 1993). Plazma membranındaki  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi akut olarak güçlü bir şekilde kovalent ya da allosterik modifikasyon ve/veya plazma membranı ve intraselüler endozomal havuzlar arasındaki  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın güçlü trafiği ile ve kronik olarak  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz sentezi ve/veya degradasyon oranlarındaki değişiklikler ile membranda  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın miktarının regülasyonu ile düzenlenmektedir (Bertorello ve Katz 1993).



Şekil 2.8  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın yapısı ve alt üniteleri (www.zuniv.net 2015d)

$\beta$  agonistleri ve katekolaminler tarafından stimüle edilen alveolar epitel boyunca aktif  $\text{Na}^+$  absorpsiyonu için ileri sürülen mekanizmalardan bazıları şunlardır:

- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın  $\alpha$ -alt ünitesi fosforilasyonunda ve bazolateral hücre membranındaki miktarında artışlar gözlenmektedir (Blanco vd. 1998).
- Akciğer hasarında  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz ve ENaK ekspresyonu artmaktadır (Lasnier vd. 1996, Wang vd. 1999).
- Kronik deksametazon stimülasyonu nedeniyle akciğer hasarı  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz ve ENaK ekspresyonunda değişiklikler gözlenmiştir (Folkesson vd. 2000, Lazrak vd. 2000b).

### 2.2.3 Alveolar reabsorpsiyonu etkileyen faktörler

**Stimüle edici faktörler:** cAMP'e bağımlı mekanizmalar, AT1 ve AT2 hücrelerindeki  $\beta$  adrenerjik ya da dopamin reseptörün stimüle edilmesi ile alveolar reabsorpsiyon artmaktadır. Glukokortikoidler, mineralokortikoidler, tiroid hormonu, dopamin ve keratonosit büyüme faktörü (KGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme

faktörleri de cAMP'ye bağımlı olmayan mekanizmalar kullanarak alveolar reabsorbsiyon arttırmaktadır (Crandall ve Matthay 2001, Matthay 2014).

**İnhibe edici faktörler:** Patojenler, hipoksi, hiperkapni, interlökin-1  $\beta$  (IL-1), interlökin-8 (IL-8) gibi sitokinler, nitrik oksit (NO) gibi oksidantlar, halotan, izofluran gibi anestetikler ve reaktif O<sub>2</sub> formları alveolar reabsorbsiyonu azaltmaktadır. Bunların yanı sıra artmış akciğer damar basıncı, istenmeyen ventilatör stratejilerin neden olduğu akciğer hasarı da alveolar reabsorbsiyonu azaltmaktadır (Matthay vd. 2002, Matthay 2014).

### 2.3 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri tüm dünyada en sık görülen kanser türüdür. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi akciğer kanserinden ölmektedir. 5 yıllık sağ kalım oranı % 15'tir. Gelişmiş ülkelerde insidens 100.000'de 71 iken gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran 100.000'de 14'tür (İdil 2000). Avrupa Birliği ülkelerinde ise 52.5 bulunmuştur. Akciğer kanserinin görülme sıklığı yaşla birlikte artar. Hastaların çoğu 50-70 yaş grubundadır. Ortalama tanı yaşı 60 civarındadır. Ancak % 3'lük kısmı 40 yaşın altındaki genç hastalardır. Türkiye'deki olguların yaş ortalaması 58.4'tür (Skuladottir ve Olsen 2001). Hastalık erkeklerde daha sık görülür. Avrupa Birliği ülkelerinde erkeklerdeki kanserlerin %21'i, kadınlardaki kanserlerin %5'i akciğer kanseridir. Bu sigara alışkanlıklarındaki farktan kaynaklanmaktadır. Akciğer kanseri erkek bireylerde ölüme neden olan birinci sıradaki kanser türüdür. Siyah ırkta beyaz ırka göre daha fazla görülmektedir (Albert ve Samet 2003).

Akciğer kanseri, etiyolojisinde çok sayıda faktörün rol oynadığı bir hastalıktır. Etiyolojik faktörlerin başında; sigara, hava kirliliği, çevresel karsinojenler, diyet, geçirilmiş akciğer hastalıkları, genetik ve immünojenik faktörler ve viral enfeksiyonlar gelmektedir (Alberg ve Samet 2003). Kalıtsal faktörler de akciğer kanseri gelişiminde araştırılmıştır ve birinci derece akrabalarda kanser olan bireylerde akciğer kanseri riski 2.4 kat artmış olarak bulunmuştur (Müsellim 2007).

Sigara, akciğer kanseri etyolojisinde başlıca sorumlu faktördür. Bindokuzyüzelli yılına kadar yapılan olgu kontrol bazlı epidemiyolojik araştırmalar sigaranın akciğer kanseri ile kuvvetli ilişkisi olduğunu göstermiştir. Sigaranın akciğer kanserine neden olduğu yönündeki ilk bulgular 1962 yılında yayınlanmıştır (Spiro ve Porter 2002). Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %90'ı sigara kullanmaktadır. Akciğer kanseri görülme riski sigara kullananlarda 24-36 kat daha fazladır. Sigara dumanında 4000'den fazla kimyasal madde bulunur. Bu maddelerinin 60'dan fazlasının kanıtlanmış karsinojen özelliği vardır. Bunların bir kısmı radyoaktif özelliktedir; radon, kurşun, bizmut ve polonyum. Özellikle polisiklik hidrakerbonlar ve N-nitrozamin pro-karsinojenik olarak tanımlanmıştır. Sigara içme süresi, içilen sigara sayısı, içilen sigara tipi ve sigaraya başlama yaşı kanser gelişimini etkilemektedir. Ayrıca sigaranın filtresiz olması ve yoğun katran içermesi de ek faktörlerdir. Pasif sigara içiminde de akciğer kanseri riski 3,5 kat artmıştır. Çünkü etrafa yayılan sigara dumanında tüm karsinojenler bulunur ve sigara filtresinden de geçmediğinden dolayı çok daha yoğundur. Sigara içen erkeklerle evli olan, sigara içmeyen kadınlarda risk 1.3 kat artmıştır. Yirmi yıldan daha az sigara içenlerde sigarayı bıraktıktan 5 yıl sonra risk çok azalır ve 10-15 yıl sonra sigara içmeyenlerle aynı düzeye inmektedir (Simonato vd. 2001, Hecht 2002).

Akciğer kanseri gelişiminin erkeklerde % 15, kadınlarda % 5 oranında mesleki maruziyet sorumlu tutulmuştur. Mesleki maruziyette en önemli madde asbesttir. Amfibol tipi daha büyük risk taşır. Diğer maddeler uranyum, kömür kurumu, katran, hardal gazı, vinil klörür, arsenik, krom, nikel, berilyum, kadmiyum, formaldehit ve polisiklik aromatik hidrokarbonlardır. Maruziyet yoğunluğu ve süresi de önemlidir. Yirmi yıl maruziyetten sonra kanser riski artmaktadır (Talcott vd. 1989).

Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanserinin ikinci en sık (%10) nedeni radon gazıdır ve her yıl 6.000-360.000 akciğer kanserli kişinin ölümünden sorumludur. Radon, kimyasal inert bir gaz olup uranyumun parçalanma ürünüdür. Solukla alındığında radon gazı akciğer epiteli veya diğer hücreler ile etkileşerek kansere neden olur. Toprakta doğal olarak bulunur ve iyi havalandırılmayan ev ve işyerlerinin altındaki topraktaki miktarına bağlı olarak kapalı mekândaki havanın radon miktarı yüksek olabilir. Sigara ile radonun etkileşimi sinerjiktir ve kanser riski 1,3-1,8 oranındadır.

Zemin kat eski binalarda yaşayanlarda sıktır, bu nedenle metro ve tünel işçileri gibi mesleki gruplar kanser riski taşır (Anonymus 2009).

Beslenme diyetindeki eksiklikler akciğer kanseri gelişiminde etkili olabilir. Vitamin A ve beta karotenden fakir beslenmenin hayvan modellerinde akciğer kanseri riskini artırdığı gösterilmiştir. İnsanlardaki çalışmalarda da diyetinde betakaroten/retinol miktarı yüksek olanlarda akciğer kanseri riskinin % 40 azaldığı tespit edilmiştir (Bouchardy vd. 2001).

Daha önceden geçirilmiş astım, tüberküloz, kronik bronşit, amfizem ve obstrüktif akciğer hastalıklarının, akciğer kanseri riskini arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Adkolfer 2001). Kronik obstrüktif akciğer hastalığında, tekrarlayan akciğer inflamasyonu ve akciğerdeki skar dokularında (örneğin tüberküloza bağlı) kanser gelişimi artmaktadır. Özellikle baş-boyun kanseri olan kişilerde akciğer kanseri daha sık görülmektedir. Bu durum, kanserojen faktörün tüm epitel yüzeyine etki yapmasına bağlıdır (Anonymus 1992).

### **2.3.1 Akciğer kanseri sınıflandırılması**

Akciğer kanserleri histolojik olarak sınıflandırılır ve epitel hücreden kaynaklanan karsinom tipindedir. Büyüklüklerine ve malign hücrelerinin görüldüğü yere göre iki ana gruba ayrılırlar. Bu gruplar küçük hücreli akciğer karsinoma ve küçük hücreli olmayan karsinomadır (Kumar vd. 2013). İki kanser alt türü arasındaki bu ayrım, klinikteki farklılıkları, metastatik yetenekleri ve tedaviye yanıtlarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.9) (Travis 2011).

#### **2.3.1.1 Küçük hücreli akciğer karsinoma (KHAK)**

Nöroendokrin hücrelerden orijin alırlar. Kultchitsky tip III olarak da adlandırılırlar. Santral hava yollarında oluşma eğilimindedirler. Tüm akciğer kanserlerinin %20-25'ini

oluştururlar. Akciğer kanserlerinin en hızlı seyreden tipidir. Oldukça agresif seyirli bir tümördür. Erkeklerde ve sigara içenlerde daha sık gözlenen bu tümörlerin ortalama görülme yaşı 60'dır. Hızlı büyüme fraksiyonu, erken sistemik yayılım gösterme ve ileri evrelerde bile kemoterapiye iyi yanıt vermesi gibi klinik, biyolojik ve genetik özellikleri ile diğer akciğer kanserlerinden ayrılırlar. Küçük hücreli karsinomlarda p53 ve retinoblastoma (Rb) genleri sıklıkla mutasyona uğramıştır. Tek varyantı Kombine Küçük Hücreli Karsinomdur (Şekil 2.9) (Aygenç vd. 2005).

### **2.3.1.2 Küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma (KHOAK)**

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomunun üç alt tipi vardır. Bunlar; Adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve yassı hücreli karsinomadır (Şekil 2.9).

#### **2.3.1.2.1 Adenokarsinom**

Adenokarsinomlar % 25-40 oranında görülür. Son yıllarda adenokarsinom oranı yükselmiş olup, skuamöz hücreli karsinoma yaklaşmıştır. Sigara içiminin tümörle ilişkisi diğer tiplere göre daha az olmakla birlikte, son yıllarda düşük katranlı sigaraların daha derin aspirasyonu ile oluşan etkinin bu tip tümörlerin artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Sigara içmeyen kadınlarda adeokarsinom daha sık görülür (Subramanian ve Govindan 2007). Tümör genellikle periferik yerleşir ve mezotelyoma ile karışabilir. Plevra ve göğüs duvarı invazyonu diğer tiplere göre daha sık görülür. Clara hücrelerinden veya AT2'den köken alırlar. K-ras mutasyonları akciğer kanserleri arasında en çok adenokarsinomlarda tespit edilir (Şekil 2.9) (Riely vd. 2008).

Subtipleri; Asiner, Papiller, Bronkioloalveoler karsinom (Non-müsinöz, Müsinöz, Mikst), Müsin içeren solid adenokarsinom, Mikst subtipler içeren adenokarsinom. Tipleri; İyi diferansiye fötal adenokarsinom, Müsinöz adenokarsinom, Müsinöz kistadenokarsinom, Taşlı yüzük hücreli karsinom, Berrak hücreli karsinom (Yoshizawa vd. 2011).

### **2.3.1.2.2 Büyük hücreli karsinom**

Kötü diferansiye hücrelerden meydana gelmiştir. Büyük hücreli karsinom terimi herhangi bir kategoriye sokulamayan tümörleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu kanser hücrelerin büyük çekirdekleri, sitoplazmaları ve göze çarpan çekirdekcikleri vardır. Akciğer karsinomlarının % 9'unu oluşturur (Şekil 2.9).

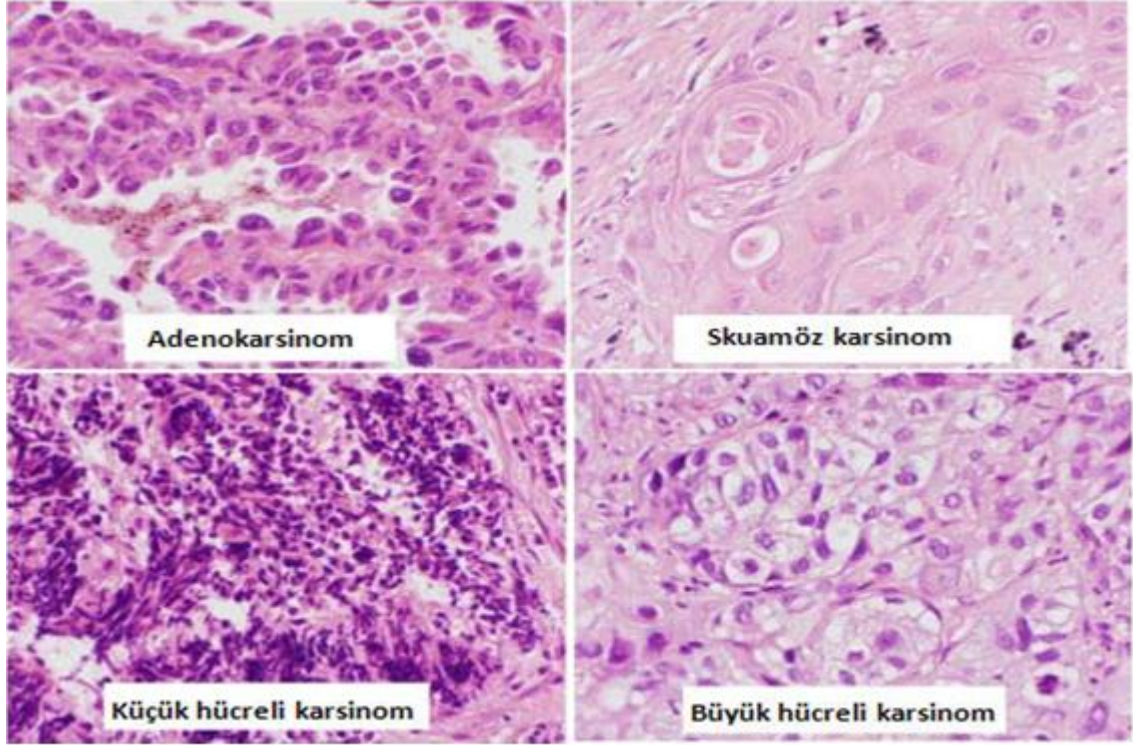
Tipleri; Büyük hücreli nöroendokrin karsinom, Bazaloid karsinom, Lenfoepitelyoma benzeri karsinom, Berrak hücreli karsinom, Rabdoid fenotipli büyük hücreli karsinom (Bulay 1995).

### **2.3.1.2.3 Skuamöz hücreli karsinom**

Akciğer karsinomları arasında % 25-40 oranında görülür. Genellikle santral yerleşmekle birlikte periferik de olabilirler. En sık kavitasyon gösteren tümördür. Sigara kullanımı ile en fazla ilişki gösteren (% 90) ve erkeklerde daha sık görülen bir tümördür. Skuamöz hücreli karsinom preoperatif biopsi materyallerinde doğru tanı oranı en yüksek olan (% 79) tümör tipidir. Diğer tiplere göre daha geç metastaz yapar ve genellikle lokal yayılma eğilimindedir. Akciğer kanserleri içerisinde p53 mutasyonlarını en sık gösteren karsinomlardır (Şekil 2.9).

Tipleri: Papiller, Berrak hücreli, Küçük hücreli, Bazaloid (Motadi vd. 2007).





Şekil 2.9 Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması (Motadi vd. 2007)

### 2.3.2 Akciğer kanseri moleküler biyolojisi

Yapılan moleküler çalışmalar ile onkogenlerin, tümör supressör genlerin ve DNA tamirinden sorumlu genlerde meydana gelen bazı değişikliklerin, akciğer kanseri ile olan ilişkisi ortaya konulmuştur. 3. ve 11. kromozomların kısa kolundaki DNA sekans kayıpları, Epidermal büyüme (growth) faktörü reseptörü (EGFR), Myc ailesi (C-Myc, N-Myc ve L-Myc), Ras ailesi (K-ras, H-Ras, N-Ras) ve p53 tümör supresör genlerin amplifikasyonu kanser gelişiminde genetik faktörler olarak rol oynarlar (Alberg ve Samet 2003, Lynch vd 2004).

p53 proteini TP53 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Genom mutasyonlarını önleyerek genomun stabilitesini koruyan ve bu nedenle “genomun koruyucusu” olarak adlandırılan p53, çok hücreli organizmalarda kritik öneme sahiptir. p53, hücre döngüsünü düzenler ve kansere karşı koruyucu bir şekilde tümör baskılayıcı olarak çalışır. KHOAK’lerinin %50’sinde p53 mutasyona uğramış haldedir. p53 proteini hücre

döngüsünü G1/S fazında inhibe eden bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. p53 mutasyona uğradığında hücre döngüsü süreci durmaksızın devam eder, dolayısıyla hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. Ayrıca p53, pro-apoptotik bir protein olan Bax'ı indükleyerek apoptozise katkıda bulunabilir (Prives 1998).

p16, hücre döngüsünde G1-S geçişini kontrol eden p16-siklin D1-Cdk4-Rb yolağının bir parçasıdır. Hücre döngüsü düzenleyicisi bu kritik yolak akciğer kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser türünde değişmiş ya da mutasyona uğramış haldedir. p16/pRb ve p53 yolaklarında meydana gelen değişiklikler KHOAK hücre hatlarında artmış proliferasyona neden olmuşlardır ve bu durum 5 yıl daha kısa yaşam süresi ve agresif tümör fenotipi ile ilişkilidir (Fong ve ark. 2003).

Amerika Birleşik Devletler'indeki KHOAK hastaların yaklaşık % 10'unda ve Uzak Doğu'daki KHOAK hastaların % 35'inde EGFR mutasyonu bulunmuştur. EGFR mutasyonları genellikle heterojendir. Bu mutasyonlar EGFR kinaz aktivitesini artırır ve böylelikle hücre proliferasyonunda artış meydana gelir. (Sordella vd. 2004). EGFR mutasyonlarına hiç sigara içmeyen adenokarsinom histolojisi olan kadın hastalarda sık rastlanılır. Fakat diğer KHOAK alt tiplerinde EGFR mutasyonları sigara içen ya da sigara bırakmış hastalarda da görülür (Paez vd. 2004).

K-Ras geni tarafından kodlanan K-Ras proteini normal doku sinyalizasyonunda temel rol oynar ve bu gende meydana gelen mutasyonların birçok kanser gelişiminde rolü bulunmaktadır (Kranenburg 2005). K-Ras mutasyonları akciğer kanserinin erken olaylarından biri olarak kabul edilmektedir ve akciğer adenokarsinomlarının üçte birinin erken aşamalarında K-Ras mutasyonu görülmektedir. K-Ras mutasyonları, sigara içen ve hiç sigara içmeyen hastalarda tespit edilmiştir. KHOAK'lerinin % 15-50'sinde görülen K-Ras mutasyonu, sağkalım süresinde azalma, erken relaps ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Riely vd. 2008).

Myc genleri, hücre proliferasyonunda, hücre farklılaşmasında ve DNA sentezinin başlatılmasında rol alan üç fosfoproteini kodlar. Bu fosfoproteinler C-Myc, N-Myc ve

L-Myc'dir (Mabry 1998). Amplifikasyon ve transkripsiyonel bozukluk ile onkogen halini alan Myc genleri KHOAK'lerinin % 8-20'sinde aktif hale gelir (Köktürk vd. 2003). C-Myc amplifikasyonu gerçekleşen hücrelerde büyüme faktörlerine gereksinim azalır, hücre siklusunda G1 fazı süresi kısalır ve bunun sonucunda proliferasyon artar. C-Myc tümör büyüme hızında artış ve sağkalım süresinde kısalma ile ilişkilidir (Fong vd. 1999).

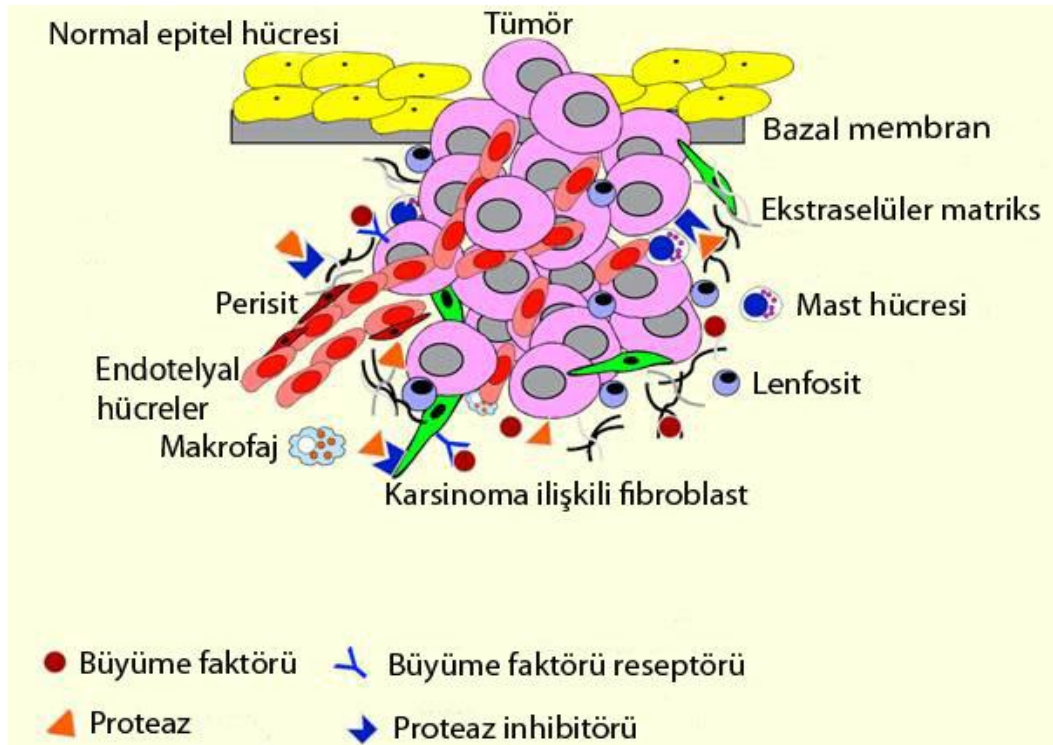
### 2.3.3 Tümör mikro çevresi

Tümör mikro çevresi (TMÇ); kan damarları, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, diğer hücreler, sinyal molekülleri, ekstraselüler matris (ECM) ve tümör dahil olmak üzere var olan hücresel bir ortamdır. Tümörü saran hücreler kanser stromasını oluşturur. Bu stromal form; fibroblast, endotel, glia, epitelyal, yağ, düz kas hücrelerinden ve ekstraselüler matrisden (ECM) meydana gelir (Li vd. 2007). TMÇ, tümörün bulunduğu bölgeye göç eden makrofajlar, lenfositler ve bu hücrelerin salgıladıkları çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, antikorlar, proteozlar, diğer tip enzimler ve çeşitli metabolitler gibi çok fazla faktörü bir arada barındırır (Şekil 2.10) (Witz ve Levy-Nissenbaum 2006). Bu hücrelerin hiçbiri kendi başına malign hücre değildir ancak TMÇ'inde birbirleriyle ve kanser hücresiyle direkt ya da indirekt etkileşim sonucu anormal fenotip kazanırlar ve fonksiyonları değişir (Li vd. 2007).

Tümör, çevresindeki mikro ortam ile yakından ilişkilidir ve sürekli etkileşim halindedir. Tümörler, ekstraselüler sinyaller salgılayarak, tümör angiogenezi başlatarak ve periferik immün tolreansı indükleyerek TMÇ'i etkileyebilir. TMÇ tümör heterojenliğine katkıda bulunur ve tümör hücrelerini modifiye eder. Bazı durumlarda TMÇ tümör gelişimi ve büyümesinde temel rol oynarken bazı durumlarda ise tümörögenezi durdurur (Bissell ve Radisky 2001, Witz ve Levy-Nissenbaum 2006).

Akciğer kanseri ve TMÇ ile yapılan çalışmalar, hipoksi ve angiogenesiz üzerine yoğunlaşmıştır (Graves vd. 2010). TMÇ genelde hipoksiktir. Tümörün kütlesi arttığı zaman kan damarlarına uzak kalır ve kan tedarik edemez hale gelir. Bu hipoksik çevre;

genetik stabiliteyi, nükleotid eksizyon tamir mekanizması ve yanlış eşleşme tamir mekanizması regülasyonunu azaltarak bozar. Böylelikle kanser gelişimi hızlanır. Hipoksi, ayrıca hipoksi indükleyici faktör1-alfa (HIF1- $\alpha$ ) ekspresyonunu stimüle eder. HIF1- $\alpha$  angiogenesi indükler ve metastaz ile ilgili genlerin aktif olmasını sağlar (Blagosklonny 2004, Bindra vd. 2005). Değişmiş ve düzensiz damarlaşma, hipoksiye katkı yapar ve alınan ilaçların etkili olarak kanserli bölgeye ulaşmasını zorlaştırır. TMC tedavi için sıkıntı yaratmasının yanı sıra fırsat da sunar. Klinik olarak uygulanabilir birçok ajan, TMC'yi sitotoksik terapi ile kanser tedavisine yanıt verir hale getirebilir (Graves vd. 2010).



Şekil 2.10 Kanser stroması ve elemanları (Koontongkaew 2013)

### 2.3.4 Kansersizasyon alanı

Kansersizasyon alanı; moleküler anomalileri olan, neoplastik lezyonlara bitişik, histolojik olarak normal görünen doku anlamına gelir. Bu moleküler anomaliler; DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kromatin değişiklikleri, mikro RNA (miRNA)

regülasyonları ya da mutasyonlar olabilir (Gompert vd. 2013). Bu konuda yapılan çalışmalar genellikle sigara içen ve sağlıklı bireyler üzerine yoğunlaşmıştır. Sigara içmenin, hava yolu epitel hücrelerinde hasara neden olduğu sitolojik ve moleküler teknikler kullanılarak gösterilmiştir. (Dakubo vd. 2007, Gompert vd. 2011). İlk olarak Auerbach ve arkadaşları sigara içmenin tüm solunum sisteminde hücresel hasara yol açtığını, sigara içenlerden alınan otopsi incelemesi sonucunda göstermiştir (Auerbach vd. 1970). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kanserizasyon alanındaki genetik ve epigenetik değişimlerin akciğer kanserizasyon aşamalarının gelişiminde başlıca bir rolü olduğunu destekler niteliktedir (Mao vd. 1997, Wistuba vd. 1997, Steiling vd. 2008).

Hücresel hasar, ilk aşamada kök hücre veya progenitör hücre tarafından yapılan düzensiz tamire yol açar ve bu durumda kendi kendine yenilenen belirsiz bir klonal form oluşturur. Ardından genetik ve epigenetik değişimler proliferasyona neden olur ve yavaş yavaş bu alandaki yayılma normal epitelyumun yerini alır. Sigarayı bıraktıktan sonra bile premalign alan yayılmaya devam edebilir (Gompert vd. 2011).

Nelson ve arkadaşları akciğer tümörüne komşu olan ve histolojik açıdan normal görünen dokuda KRAS mutasyonları olduğunu belirtmişlerdir (Nelson vd. 1996). Yine benzer şekilde akciğer adenokarsinom hücrelerine bitişik ve histolojik açıdan normal görünen dokuda EGFR mutasyonu bildirilmiştir (Tang vd. 2008). Sigara içen sağlıklı bireylerden alınan ve normal görünen bronşial epitelyum örneklerinde mRNA ve miRNA ekspresyon profili çıkarılmış, sigaranın dönüşümlü ve geri dönüşümsüz genetik etkileri belirlenmiştir (Spira vd. 2004). Yine sigara içen sağlıklı bireylerde yapılan bir çalışmada bronşial epitel hücrelerde telomeraz protein ekspresyonunda bir artış olduğu saptanmıştır (Miyazu vd. 2005).

Genel olarak, anormal p16 promotör metilasyonuna akciğer kanserlerinde sık rastlanılır (Belinsky vd. 1998). Belinsky ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sigarayı bırakan ve sigara içen bireylerde, bronşial epitelyumda anormal p16 ve ölüm ilişkili protein kinaz (DAPK) promoter metilasyonu gözleendiği halde hiç sigara içmeyen bireylerde bu durum gözlenmemiştir (Belinsky vd. 2002). Birçok çalışma, büyük havayolu epitel

hücrelerinde sigara içen ve sigarayı bırakan bireylerde, akciğer kanseri olan veya akciğer kanseri olmayan hastalarda allel kaybı, p53 mutasyonu ve promoter metilasyonda değişimler olduğu tespit edilmiştir (Franklin vd. 1997. Guo vd. 2004, Bhutani vd 2008).

KHAK hastalarından alınan örneklerle akciğer adenokarsinom hastalarından alınan periferik ve akciğer merkezindeki bronşial epitel hücreleri karşılaştırıldığında moleküler anomalilere daha az rastlanılır. Bu durum, akciğerin farklı kısımları sigara kaynaklı genetik hasardan farklı derecede etkilendiği düşüncesini destekler. İnflamasyon ve sinyal yollarının aktivasyonu gibi bazı moleküler değişiklikler hem merkez havayollarında hem de periferik havayollarında görülürken genetik kararsızlık, allel kaybı gibi diğer değişiklikler ya merkez havayollarında ya da periferik havayollarında görülür (Kadara vd. 2012).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Çözeltiler

##### **Dengelenmiş Tuz Solüsyon Tamponu (BSSB)**

NaCl (137 mM) (Merck, Almanya)	8 gr
KCl (5 mM) (Applichem, Almanya)	0,40 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,7 mM) (Sigma, ABD)	0,14 gr
CaCl <sub>2</sub> (1,8 mM) (Merck, Almanya)	0,265 gr
MgSO <sub>2</sub> (1,2 mM) (Merck, Almanya)	0,29 gr
Glukoz (5,5 mM) (Sigma, ABD)	1 gr
HEPES (10 mM) (Sigma, ABD)	10 ml
Penisilin/Streptomisin	5 ml

Distile suda çözülüp 1 L'ye tamamlandı. Tris-HCl ile pH'ı 7,62 olarak ayarlandı. ve 0,2-µm por yarıçapı olan filtreden geçirilerek steril edildi.

##### **10x Fosfat Tuz Tamponu (PBS)**

NaCl (130 mM) (Merck, Almanya)	7,59 gr
KCl (5,4 mM) (Applichem, Almanya)	0,40 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,6 mM) (Sigma, ABD)	0,70 gr
Glukoz (11 mM) (Sigma, ABD)	1,98 gr
HEPES (10,6 mM) (Sigma, ABD)	10,6 ml

Distile suda çözülüp 100 ml'ye tamamlandı. Tris-HCl ile pH'ı 7,62 olarak ayarlandı ve 0,2-µm por yarıçapı olan filtreden geçirilerek steril edildi.

### **Magnetik Çekirdek Kolon Yıkama Tamponu**

10×PBS	10 ml
EDTA (Sigma, ABD)	54,5 mg
BSA	0,5 gr

Distile suda çözülüp 100 ml'ye tamamlandı. 0,2-µm por yarıçapı olan filtreden geçirilerek steril edildi.

### **Hafif (Light) Percoll Solüsyonu**

10×PBS	4 ml
Percoll (Sigma, ABD)	10,9 ml
dH <sub>2</sub> O	25,1 ml

### **Ağır (Heavy) Percoll Solüsyonu**

10×PBS	4 ml
Percoll (Sigma, ABD)	26 ml
dH <sub>2</sub> O	10 ml

### **Enzim Solüsyonu**

DNaz (Serva, Almanya)	15,000 U/mg
Tripsin (Sigma, ABD)	1,500 U/mg
Elastaz (Worthington, ABD)	9 U/mg

BSSB'de çözülüp 40 ml'ye tamamlandı.

### **İnhibisyon Solüsyonu**

DNaz (Sigma, ABD)	15,000 U/mg
DMEM/F12 (Sigma, ABD)	30 ml
FCS (Sigma, ABD)	10 ml



### **Adezyon Solüsyonu**

DNaz (Sigma, ABD)	15,000 U/mg
DMEM/F12 (Sigma, ABD)	22,5 ml
DMEM (Sigma, ABD)	22,5 ml

### **Krebs Tamponu**

NaCl (141 mM) (Merck, Almanya)	8,24 gr
KCl (5,4 mM) (Applichem, Almanya)	0,40 gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,78 mM) (Sigma, ABD)	0,94 gr
CaCl <sub>2</sub> (1,8 mM) (Merck, Almanya)	0,265 gr
MgCl <sub>2</sub> (0,8 mM) (Merck, Almanya)	0,162 gr
Glukoz (5 mM) (Sigma, ABD)	0,9 gr
HEPES (15 mM) (Sigma, ABD)	15 ml

Distile suda çözümlü 1 L'ye tamamlandı. Tris-HCl ile pH'ı 7,62 olarak ayarlandı.

### **Tris 1 (0,5 M)**

Tris-Base (Carl Roth, Almanya)	6,057 gr
--------------------------------	----------

Distile suda çözümlü 100 ml'ye tamamlandı. HCl ile pH'ı 6,8 olarak ayarlandı.

### **Tris 2 (1,5 M)**

Tris-Base (Carl Roth, Almanya)	18,17 gr
--------------------------------	----------

Distile suda çözümlü 100 ml'ye tamamlandı. HCl ile pH'ı 8,8 olarak ayarlandı.

### **10X Koşturma Tamponu (Running Buffer)**

Tris (Carl Roth, Almanya)	30 gr.
Glisin (Serva, Almanya)	144 gr.
Sodyum Dodesulfat (SDS) (Applichem, ABD)	10 gr.

Distile suda ozölüp 1 L'ye tamamlandı. HCl ile pH'ı 8,3 olarak ayarlandı.

### **1X Koşturma Tamponu (Running Buffer)**

10X Koşturma Tamponu	100 ml
dH <sub>2</sub> O	900 ml

### **10 X Transfer Tamponu**

Tris-Base (Carl Roth, Almanya)	40 gr
Glisin (Serva, Almanya)	144 gr

Distile suda ozölüp 1 L'ye tamamlandı. HCl ile pH'ı 8,3 olarak ayarlandı.

### **1 X Transfer Tamponu**

10X Transfer Tamponu	100 ml
Methanol (Merck, Almanya)	200 ml
dH <sub>2</sub> O	700 ml

### **4X Örnekleme Tamponu (Sample Buffer)**

Tris (1 N) pH:6,8	2,5 ml
Gliserol (Serva, Almanya)	4 mL
SDS (Applichem, ABD)	0,8 gr
Bromfenol Blue (Sigma, ABD)	160 µl
dH <sub>2</sub> O	8 ml

Kullanmadan önce 1/5 oranında β-merkaptotanol (Sigma, ABD) eklendi.

### **10X Tris Tuz Tamponu (TBS)**

NaCl (Merck, Almanya)	80 gr
Tris-Base (Carl Roth, Almanya)	24,2 gr

Distile suda çözülüp 1 L'ye tamamlandı.

### **1X Tris Tuz Tamponu (TBS)**

10X TBS	100 ml
Distile su (dH <sub>2</sub> O)	900 ml

### **Western Blot Yıkama Tamponu (TBS-T)**

Tween (Roth, Almanya)	1 ml
TBS	1000 ml

### **Western Blot Bloklama Tamponu**

Süt tozu (Roth, Almanya)	5gr
TBS-T	100 ml

### **% 4'lük SDS-PAGE Yayma Jeli**

Distile su (dH <sub>2</sub> O)	5600 µl
%30 Akrilamid Solüsyonu (Applichem, Almanya)	1300 µl
%2 Bisakrilamid Solüsyonu (Applichem, Almanya)	500 µl
Tris 1	2500 µl
% 10 SDS (Applichem, Almanya)	100 µl
TEMED	10 µl
% 10 APS	100 µl

### **% 10'luk SDS-PAGE Ayırma Jeli**

Distile su (dH <sub>2</sub> O)	5700 µl
%30 Akrilamid Solüsyonu (Applichem, Almanya)	6500 µl
%2 Bisakrilamid Solüsyonu (Applichem, Almanya)	2600 µl
Tris 2	5000 µl
%10 SDS (Applichem, Almanya)	200 µl
TEMED	10 µl
%10 APS	100 µl

## **3.2 Yöntemler**

### **3.2.1 Hücre kültürü**

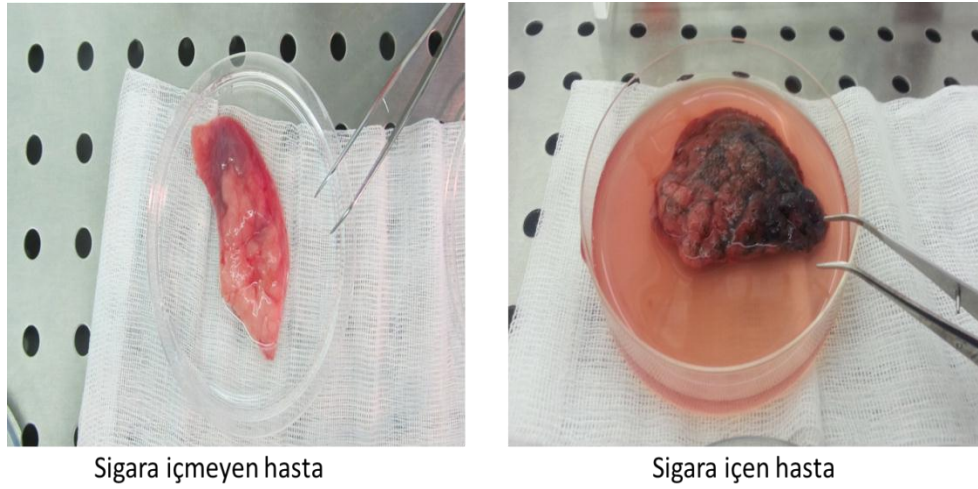
Yapılan deneylerimiz boyunca üç farklı hücre kullanıldı. Bunlardan bir tanesi insan akciğer adenokarsinom hücresi olan H1975'dir (ATCC, ABD). H1975, %10 FCS (Biochrom, Almanya), streptomisin-penisilin (Sigma, ABD) ve 2 mM L-Glutamik asit (PAA, Almanya) içeren DMEM (Sigma, ABD) besiyeri içinde kültür edildi. Diğer bir insan akciğer adenokarsinom hücresi olan A549 (ATCC, ABD) ise %10 FCS, 50µg/ml gentamisin-sülfat (Serva, Almanya) ve 2 mM L-Glutamik asit içeren DMEM besiyeri içinde kültür edildi (Çizelge 3.1). Primer hücre olarak kullanılan ise AT2'dir. AT2 hücre izolasyonu ve kültür koşulları aşağıda açıklanmıştır. Kültür steril koşullar altında 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ihtiva eden etüvlerde gerçekleştirildi (Mairbäurl vd. 1997).

Çizelge 3.1 Akciğer kanser hücrelerinin özellikleri (www.atcc.org 2015e)

<b>Hücre serisi</b>	<b>Morfolojisi</b>	<b>Hastalık</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Yaş</b>	<b>Sigara içimi</b>
<b>A549</b>	Epitel	Akciğer Adenokarsinom	Erkek	58	Evet
<b>H1975</b>	Epitel	Akciğer Adenokarsinom	Kadın		Hayır

### 3.2.1.1 Alveolar epitel tip-2 (AT2) hücre izolasyonu

Kanser hücreleri ile ko-kültür ve kanser hücrelerinden toplanan koşullandırılmış besiyeri ile yapılan deneylerde kullanılmak amacıyla sağlıklı AT2 hücresi izole edildi. Akciğer operasyonu geçirmiş hastaların patolog tarafından sağlıklı olduğu onaylanan dokusu alındı (Şekil 3.1) Alınan doku aşağıdaki aşamalardan geçirilerek primer insan alveolar epitel tip 2 (AT2) hücre izolasyonu yapıldı.



Şekil 3.1 Sigara içen ve içmeyen hastalardan alınan sağlıklı doku örnekleri

Dengelenmiş Tuz Solüsyon Tamponu (BSSB) ve DMEM kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C’de ısıtıldı. Akciğer dokusunun ağırlığı tartıldı ve BSSB ile birkaç defa kan hücrelerini uzaklaştırmak için yıkandı. Dokudan büyük kan damarları ve bronşlar uzaklaştırılarak doku yaklaşık 1 cm<sup>3</sup>’lük parçacıklar şeklinde kesildi. Doku parçacıkları, doku doğrama aletinde (McIlwain, Almanya) 500 µm inceliğinde parçalandı. Parçalan dokular 25 ml BSSB içeren 50 ml’lik falkonun içine kondu ve karıştırıldı. Dokuyu sıvıdan ayırmak için 100 µm’lik hücre filtreleri kullanıldı. Doku yeniden 25 ml BSSB içeren 50 ml’lik falkonun içine kondu ve bu işlem BSSB berraklaşınca kadar birkaç kez tekrarlandı.

Enzim çözeltisinin içine konan doku, 40 dakika 37 °C'de sallanan su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Enzimatik reaksiyon inhibisyon çözeltisinin eklemesi ile durduruldu. 25 ml'lik pipet kullanılarak 10 dakika karıştırıldı. Bu aşama çok sayıda hücre elde edilmesi açısından önemlidir. Ardından steril gazlı bez kullanılarak doku parçacıkları ile çözelti birbirinden ayrıldı. Doku parçacıkları atıldı. Çözeltiden 40 µm'lik hücre filtreleri kullanılarak küçük doku parçacıkları uzaklaştırıldı.

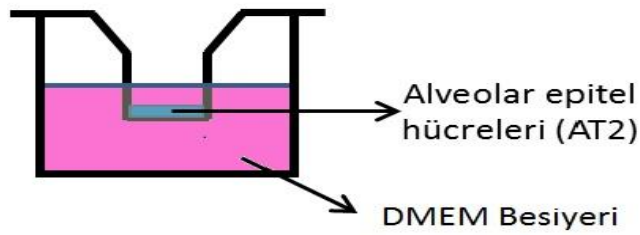
Sonra hücre çözeltisi eşit miktarda 2 tane falkon içerisine kondu ve 5 dakika 300 g'de oda ısısında santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve her bir pellet 15 ml adezyon çözeltisi kullanılarak çözüldü. Hücre kültürü petri kaplarına konan hücre çözeltisi 90 dakika 37°C'de hareket ettirilmeksizin etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra petri kaplarından çözelti toplandı. Ardından 10 ml BSSB ile petri kapları yıkandı. Hepsi falkonlara kondu ve 5 dakika 300 g'de oda ısısında santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve her bir pellet 0,5 ml BSSB ile çözüldü.

Bir tübe 4 ml hafif percoll solüsyonu kondu. Ardından enjektör ile 4 ml ağır percoll solüsyonu tüpün altına hafif percoll solüsyonuna karışmayacak bir şekilde enjekte edildi. Bu percoll gradient solüsyonunun en üst kısmına hücre çözeltisi eklendi ve 20 dakika 300 g oda ısısında fren (brake) kullanmadan santrifüj edildi. Santrifüjden sonra percoll solüsyonlarının kesiştiği yerde hücreler görünür bir katman oluşturmaktadır. Hücreler dikkatlice o katmandan pipet kullanılarak toplandı. Toplanan hücreler BSSB ile toplam hacim 12 ml'ye tamamlandı ve 5 dakika 300 g hızında, oda ısısında santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet 12 ml BSSB ile çözüldü. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.

Son santrifüjten sonra pellet 1 ml BSSB ile çözüldü ve hücre sayımı yapıldı. Hücre miktarına göre firmanın talimatına uygun olarak epitel hücreye spesifik antikorla kaplı magnetik çekirdek ve blok edici reaktif (Miltenyi Biotec, Germany) ile muamele edildi. 30 dakika 4°C'de baş aşağı karıştırılarak inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası BSSB ile toplam hacim 12 ml'ye tamamlandı ve 5 dakika 300 g oda ısısında santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve pellet 1 ml BSSB ile çözüldü. Bu sırada MiniMACS tutucu ve mıknatıs (Miltenyi Biotec, Almanya) hazırlandı ve magnetik ayırıcı kolon 0,5 ml yıkama tamponu ile muamele edildi ve akması beklenildi. Ardından 1 ml'lik hücre çözeltisi kolondan geçirildi. Hücre çözeltisi kolondan geçtikten sonra kolon 4 defa 0,5 ml BSSB ile yıkandı.

Son aşama olarak kolon miktanistan ayrı bir 15 ml'lik falkona kondu ve 1 ml DMEM besiyeri ile hızlıca basınç uygulanarak ittirildi. Elde edilen hücre, saflığı yüksek AT2 hücrelerdir. Epitel hücreler polarize özellikte oldukları için insert filtreler sayesinde kültür koşullarında bu özelliklerini korurlar. Filtrenin üst tarafı apikal tarafı oluştururken, alt tarafı ise bazolateral tarafı oluşturur. Hücre sayımı yapıldıktan sonra deney planına uygun olarak hücreler transwell insert (Corning, ABD) filtrelerin apikal tarafına %10 FCS, 50µg/ml gentamisin-sülfat (Serva, Almanya) ve 2 mM L-Glutamik asit içeren DMEM besiyeri ile ekildi. Deneye başlayana kadar mono-kültürü yapıldı (Şekil 3.2). Hücreler ekildikten sonra ilk üç gün herhangi bir muamele yapılmadı. Üçüncü günden sonra besiyeri değiştirildi ve 4. gün deneye başlandı. Deney süresince her gün besiyeri değiştirilmeye devam edildi (Ehrhardt vd. 2004, Duam vd. 2012).



Şekil 3.2 Mono-kültürün şematik olarak gösterilmesi

### 3.2.1.2 Ko-kültür ve koşullandırılmış besiyeri deneyleri

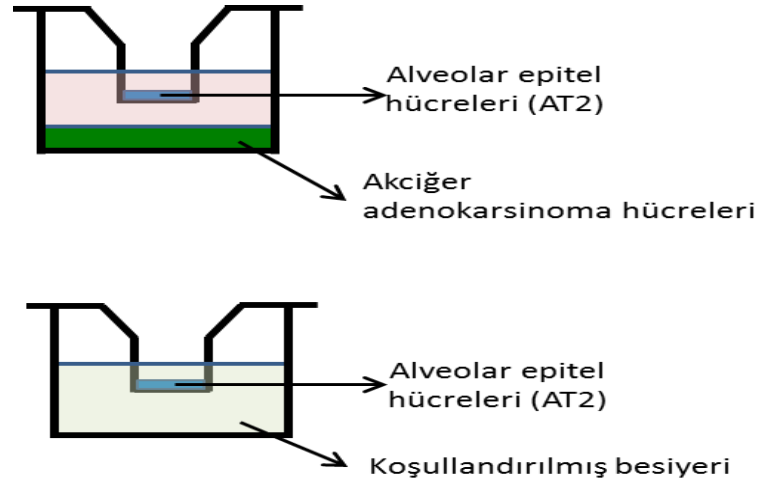
Dokudan izole edilen primer insan AT2 hücreleri filtrelere ekildikten 3 gün sonra deneye başlandı. İlk deney grubu kanser hücre serisinden elde edilmiş koşullandırılmış

besiyeri ile yapıldı. Koşullandırılmış besiyeri; 2 günlük kültürü yapılan kanser hücre serilerinden (A549 ve H1975) toplanan besiyeridir. Bu besiyeri, kültüre edilen hücrelerden salgılanan metabolitleri, büyüme faktörleri, ekstraselüler maktriiks proteinleri, vb. içerebilir. Bu deney sayesinde kanser hücreleri tarafından salgılanan faktörlerin etkileri ortamda direkt hücre olmadan anlaşılabilir. Filtrelere ekilen AT2 hücrelerinin her iki tarafına (Apikal ve bazolateral) da 24., 48. ve 72. saat zaman diliminde koşullandırılmış besiyeri uygulandı. Koşullandırılmış besiyeri deney sürecince hergün yenilendi.

Ayrıca koşullandırılmış besiyerinden salgılanan maddelerin yarattığı etkiyi daha iyi anlayabilmek amacıyla, filtrasyon işlemi uygulandı. A549 ve H1975 koşullandırılmış besiyeri, sadece 10.000 moleküler ağırlığa kadar küçük molekülleri geçiren filtreler kullanılarak filtrasyonu (Beckman, Almanya) yapıldı. Normal A549 ve H1975 koşullandırılmış besiyeri ve filtrelenmiş moleküler ağırlığı 10.000'den küçük olan molekülleri içeren A549 ve H1975 koşullandırılmış besiyeri AT2 hücrelerine 24 saat boyunca uygulandı.

Diğer deney grubu ise, AT2 hücresi ile kanser hücrelerini aynı ortamda kültür edilmesi esasına dayanan ko-kültür deneyidir. Bu deney sayesinde hücre-hücre etkileşimi anlaşılabilir. Filtrelere ekilen AT2 hücrelerinin bazolateral tarafına 50.000, 100.000 ve 250.000 gibi değişik sayılarda kanser hücreleri (A549 veya H1975) ekildi. Deney 24., 48. ve 72. saat zaman diliminde yapıldı ve ekimden sonraki 24. ve 48. saatlerde besiyerleri yenisiyle değiştirildi. Deney sürecince hergün taze besiyeri ile yenilendi (Şekil 3.3). Aynı zamanda ko-kültür deneyi normal platelerin yanı sıra net etkinin gözlemlendiği 100.000 hücre ekilerek gaz geçirgen platelerde de tekrar edildi (Siegfried 1989, Zuegel vd. 2008).





Şekil 3.3 Ko-kültür ve koşullandırılmış besiyeri deneyinin şematik olarak gösterilmesi

### 3.2.2 Transepitel elektriksel rezitans (TEER) ölçümü

Transepitel Elektriksel Rezitans (TEER); alveolar bariyer gerginliğinin göstergesidir. Bu nedenle deneye başladıktan sonra 24., 48. ve 72. saat zaman diliminde TEER ölçümleri yapıldı. Bu işlem için EVOM (World Precision Instruments, ABD) cihazı kullanıldı. Ölçümler EVOM cihazına bağlı elektrotun kısa ucu filtrenin apikal tarafa uzun olan diğer ucu da bazolateral tarafa konularak steril koşullar altında yapıldı (Cheek vd. 1989).

### 3.2.3 Ussing düzeneği deneyi

Kanser hücreleri ile ko-kültürü yapılan ve koşullandırılmış besiyeri ile muamele edilen AT2 hücrelerinde,  $Na^+$  iyon transport aktivitesini belirlemek amacı ile Ussing düzeneği kullanılmıştır. Ussing Düzeneği, kısa devre akımını gösterge olarak kullanan epitel ve polarize olan hücrelerde iyon transportunu ölçen bir cihazdır. Bu cihaz, 1950'li yıllarda kurbağa derisindeki iyon transport mekanizmasını tanımlayan Hans Ussing tarafından bulunmuştur. Ussing düzeneği, birbirine kenetlenen iki yarım odacıktan oluşur ve geçirgen filtrelere ekilen tek tabaka halindeki hücreler bu odacıkların arasına yerleştirilir. Epitel hücreler, apikal ve bazolateral tarafı olan polarize hücrelerdir. Bu nedenle Ussing düzeneğinde bu tarafları ayırmak mümkündür. İyon transportu

gerçekleştğinde potansiyel fark değişir. Potansiyel fark, hücrenin yakınına yerleştirilen iki voltaj elektrotu ile ölçülür. Bu gerilim, hücrenin uzağına yerleştirilen başka iki akım elektrotu ile dengelenir. Sisteme kaydedilen voltaj ve rezistans değerleri kullanılarak; Voltaj(V) =Akım(I) x Resistans(R) formülü esas alınır ve kısa devre akımı hesaplanır. Bu kısa devre akımı (KDA) epitel hücrelerde olan net iyon transportun ölçüsüdür.

AT2 hücreleri odacıkların arasına yerleştirildikten sonra odacıklar önceden su banyosunda 37 °C'de ısıtılmış 10 ml Krebs tamponu ile dolduruldu. Ölçülmeye başlandıktan sonra yaklaşık 10 dakika bazal akım sabitlene kadar beklenildi. Ardından amilorid duyarlı epitel sodyum kanalı (ENaK) inhibitörü olan amilorid (Sigma, ABD) final konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde eklendi ve 5 dakika ölçümü yapıldı. Apikal plazma membranında por açan amfoterisin B (Sigma, ABD) son konsantrasyonu 5 µM olacak şekilde eklendi. Böylelikle intraselüler Na<sup>+</sup> konsantrasyonu arttırıldı ve Na<sup>+</sup>/P<sup>-</sup>-ATPaz'ın Na<sup>+</sup> pompalama aktivite ölçümüne yaklaşık 10 dakika kadar devam edildi. Tüm ölçümler TECC-2 (EP Devices, Belçika) adlı bilgisayar programına kaydedildi. Düzeneğin altından geçen sıcak su sirkülasyonu sayesinde bütün ölçümler 37 °C'de gerçekleştirildi (Mairbäurl vd. 2002, Clarke 2009).

### **3.2.4 Proliferasyon deneyi**

A549 ve H1975 kanser hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerlerinin AT2 hücre proliferasyonu üzerine etkisinin olup olmadığını anlamak için kristal viyole (KV) proliferasyon deneyi yapıldı. Deney, boyanın hücre çekirdeğini boyama esasına dayanır.

96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 20.000 AT2 hücresi ekildi. AT2 hücrelerine kontrol grubuna DMEM, deney grubuna A549 ve H1975 koşullandırılmış besiyeri uygulandı. Hergün besiyerleri yenilendi. 24., 48. ve 72. saat sonunda proliferasyon deneyi yapıldı.

Hücrelerin besiyeri alındıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Ardından 100 µl KV (0,25 mg/ml) eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 200 µl

dH<sub>2</sub>O ile 3 defa yıkandı. 200 µl metanol (Merck, Almanya) ile lizis edildi ve spektrometrede 555 nm absorbandsda (Thermo Electron Corporation, ABD) okutuldu (Vega-Avila ve Pugsley 2011).

### **3.2.5 Glukoz ve laktat ölçümü**

Kanser hücreleri yoğun metabolik aktiviteye sahiptir. Dolasıyla fazla glukoz tüketip, laktat üretirler. Artan laktat miktarı ortamın pH'sını asitleştirir. Metabolik aktiviteyi incelemek için A549 ve H1975 kanser hücreleri ile ko-kültürü yapılan primer insan AT2 hücrelerinin süpernatantlarından örnekler alındı. Her bir örnekten 20 µl alındı ve bu miktarın üstüne 1000 µl hemolizat sistem solüsyonundan eklendi. Böylelikle 1/50 dilüsyonu yapılan örneklerin Super GL Ambulance (Dr. Müller Geraetebau, Almanya) cihazında oda sıcaklığında ölçümleri yapıldı.

### **3.2.6 Ekzozom izolasyonu ve uygulanması**

Hücrelerden salgılanan ve diğer hücelere ulaşarak o hücrede faaliyet gösterebilen ekzozomların iyon transportu üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını anlayabilmek için kanser hücre serilerinin koşullandırılmış besiyerinden izole edilen ekzozomlar AT2 hücrelerine uygulandı. Bu deneyde, koşullandırılmış besiyeri (A549 ve H1975), izole edilen ekzozom içeren besiyeri ve ekzozomlarından uzaklaştırılmış süpernatant ile AT2 hücreleri 24. saat süre ile muamele edildi.

Ekzozom izolasyonu genel olarak santrifüjasyon üzerine kuruludur. Öncelikle, taze olarak toplanan koşullandırılmış besiyerleri, hücrelerden uzaklaştırmak için 300 g 10 dakika santrifüj edildi. Pellet atılıp, toplanan süpernatant, tekrar 2000 g 10 dakika ölü hücrelerden uzaklaştırmak için santrifüj edildi. Yine pellet atılıp süpernatant toplandı ve 10.000 g 30 dakika santrifüj edildi. Hücre parçacıklarından oluşan pellet atıldıktan sonra son defa 25.000 g 60 dakika santrifüj edildi. Elde edilen pellet, büyük vezikülleri içeren ekzozomlardır. Pellet başlangıç hacim kadar DMEM besiyeri içerisinde çözdürüldü.

Toplanan süpernatant ve çözdürülmüş ekzozomlar deneyde kullanılabildiği kadar -80 °C’de saklandı (They vd. 2006).

### **3.2.7 Büyüme faktörleri ve sitokin düzeylerinin luminex yöntemi ile belirlenmesi**

Kanser hücreleri çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, kemokinler vb. salgılar. Bu moleküller proliferasyon, angiogenez gibi bazı biyokimyasal mekanizmaları tetikler. Bu nedenle, yapılan deneyle önceden kanser hücrelerinde tespit edilmiş büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin düzeyi belirlenmesi amaçlanmıştır. A549 ve H1975 kanser hücreleri ile ko-kültürü yapılan AT2 hücrelerin 24., 48. ve 72. saat örneklerinden ve kanser hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerlerinden süpernatantlar alındı. 10.000 g’de 5 dakika santifüj edildi. Pelet atılıp süpernatantı toplandı. Büyüme faktörleri ve sitokin düzeylerinin Luminex yöntemi ile ölçümü için Bioplex Sistem (Biorad, ABD) kullanıldı ve deney firmanın talimatına uygun olarak yapıldı.

Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), Angiopoitein-2, Monosit kemotaktik protein (MCP-1) ve İntraselüler Adezyon Molekül-1 (ICAM-1) düzeylerinin ölçümü için Biorad firmasından (ABD) kitler alındı. Her bir molekül için ayrı standart solüsyonları hazırlandı. Standart aralığı 30.000 pg/ml ile 1.83 pg/ml olacak şekilde dilüsyon tamponu ile seri dilüsyonları yapıldı. Manyetik çekirdek stoğundan gerekli miktar alındı ve deney tamponu içinde hazırlandı. 20 dakika oda sıcaklığında ışıktan koruyarak bekletildi.

96 plağa kullanılmak istenen kuyucuk kadar 50 µl manyetik çekirdek eklenerek kuyucuklar kaplandı ve 2 defa yıkandı. Ardından standartlardan ve örneklerden 50 µl konuldu. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası plak 3 defa yıkandı. Önceden hazırlanan tarama (detection) antikordan her bir kuyucuğa 25 µl eklendi. Yine oda sıcaklığında çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi.

Bu aşamanın ardından plak tekrar 3 kez yıkandı. Üretici firmanın talimatı doğrultusunda streptavidin hazırlandı ve her bir kuyucuğa 50 µl eklendi. Işıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile plak kaplandı ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda 10 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası plak yine 3 defa yıkandı. Kuyucuklara 125 µl deney tamponu eklendi. 600 rpm'da 30 saniye kadar çalkalandı. Bio-Plex 3D Süspansiyon Dizi Sistemi (Biorad, ABD) kullanarak ölçüm yapıldı (Oliver vd. 1998, Keyes vd. 2003).

### **3.2.8 Toplam RNA izolasyonu**

mRNA ekspresyonunu ölçmek bir seri işlem gerektirmektedir. Bunun için öncelikle ko-kültür ve koşullandırılmış besiyeri deney örneklerinden toplam RNA izole edildi. Toplam RNA izolasyonu için Rneasy-micro kiti kullanıldı (Quiagen, Almanya). Firmanın kullanım talimatına uygun olarak yapıldı ve kitin içeriğindeki çözeltiler kullanıldı. Toplam RNA elde etmek için hücreler, β-merkaptoetanol içeren RLT tampon çözeltisi ile lizis edildi. Lizatlar bu şekilde izolasyon yapılmaya kadar -80 °C'de saklandı. Deneye başlamadan önce lizatlar 37 °C'deki su banyosunda kısa bir süre tuzları çözmek için bekletildi.

Lizatın üstüne 300 µl % 70'lik etanoldan (Merck, Almanya) eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra lizat, kitin içeriğinde bulunan Rneasy MinElute Spin kolona aktarıldı ve 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Kolonlara 350 µl RW1 tampon çözeltisinden eklendi ve tekrar 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Kolonların alt kısmındaki toplama tüplerine inen sıvı uzaklaştırıldı.

Dnaz-1 içeren RDD tampon çözeltisinden her bir kolona 80 µl konuldu ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. Bu işlem sonrasında tekrar 350 µl RW1 tampon çözeltisinden eklendi ve 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Kolonların toplama tüpüne inen sıvı uzaklaştırıldı.

Bu defa 500 µl RPE tampon çözeltisinden eklendi ve 15 saniye 8000 g'de santrifüj edildi. Yine alt kısımdaki sıvı uzaklaştırıldı. 500 µl % 80 etanol çözeltisinden eklendi ve 2 dakika 8000 g'de kolonun içindeki silika-jel membranın kuruması için santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası Rneasy MinElute Spin kolonlar yeni toplama tüplerine kondu. Ağızları açılarak en yüksek hızda (16.000 g) 5 dakika santrifüj edildi. Kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve 20 µl RNaz içermeyen su eklenerek 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi ve ependorf tüpüne akan RNA toplandı. Kullanıma kadar -80 °C'de saklandı (Inglis ve Valadares-Inglis 1997).

### **3.2.9 Toplam RNA'dan cDNA eldesi**

mRNA ekspresyonunu ölçmek için gereken 2. aşama ise toplam RNA'dan cDNA elde edilmesidir. Önceden izole edilmiş RNA'nın miktar ölçümü için, mikro volum ölçüm yapabilen Colibri spektrometre (Titertek Berthold, Almanya) kullanıldı.

RNA'dan cDNA eldesi için Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, ABD) kiti kullanıldı. 0,1 µg/ml olacak şekilde, gerekli miktar alındı. Sonra RNA solüsyonunun içine 1µL nükleotid dNTP (normal deoksinükleotitfosfatlar), 1µL Random Primers eklendi ve son hacim distile su ile 12µL'ye tamamlandı. 65 °C'de 5 dakika kuru ısıtıcıda (Biometra, Almanya) inkübe edildi.

Daha sonra buz üzerinde; 0,1 M dTTP'den 2µL, 5X first strand buffer'dan 4µL, Rnaz out'dan 1µL eklendi ve 25 °C'de 2 dakika inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası Superscript Reverse Transcriptase'dan 1µL kondu ve karıştırıldı. Böylece son hacim 20µL oldu. Daha sonra sırasıyla 10 dakika 25 °C'de, 50 dakika 42 °C'de ve 15 dakika 70 °C'de inkübe edildi. Elde edilen cDNA kullanıma kadar -20 °C'de saklandı (Kotewicz vd. 1985).

### 3.2.10 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real time-PCR)

$\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK,  $\gamma$ -ENaK ve  $\alpha$ 1-Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz alt ünitelerinin mRNA ekspresyonundaki değişimi inceleyebilmek için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. Normal ve geçirgen plate kullanarak ko-kültürü yapılan AT2 ve kanser hücrelerinden (A549 ve H1975) elde edilmiş ve koşullandırılmış besiyeri (A549 ve H1975) ile yapılan deney cDNA örneklerine, LightCycler 480 cihazında (Roche, Almanya) gerçek zamanlı-PCR yapıldı.  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK,  $\gamma$ -ENaK,  $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz ve 18S rRNA (internal kontrol) Universal Probe Library (Roche, Almanya) primerleri kullanıldı. cDNA örneklerinin 1/25 oranında dilüe edildi. Her bir örnek için 2  $\mu$ l cDNA, 0,8  $\mu$ l reverse primer, 0,8  $\mu$ l forward primer, 1,3  $\mu$ l nükleaz uzaklaştırılmış H<sub>2</sub>O, 0,1  $\mu$ l prob, 5  $\mu$ L Absolute QPCR Capillary Mix kullanıldı.

Universal Probe Library kullanılarak bulunan primer sekansları çizelge 3.1 gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Universal Probe Library'den alınan primer ve primer sekansları

Primer Adı	Primer Sekansları
18S rRNA forward	5'-ATCCATTGGAGGGCAAGTC-3'
18S rRNA reverse	5'-GCTCCAAGATCCAACACTACG-3'
$\alpha$ -Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz forward	5'-TCTTGATTCTCCAGCGACA-3'
$\alpha$ -Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz reverse	5'-GGCTCATACTTATCACGTCCAA-3'
$\alpha$ -ENaK forward	5'-AGATTCTGTCGCTTCCATC-3'
$\alpha$ -ENaK reverse	5'-TGCAGAGGTCTAGGGTCCTG-3'
$\beta$ -ENaK forward	5'-GGGACCAAAGCACCAATATC-3'
$\beta$ -ENaK reverse	5'-GAAGTAGATGTTGAGCTTGACAATTC-3'
$\gamma$ -ENaK forward	5'-GCTGCCTACTCGCTCCAG-3'
$\gamma$ -ENaK reverse	5'-GTACTGGGCACACCCACAT-3'

### **Universal Probe Library PCR protokol:**

Denatürasyon: 95 °C’de 10 dakika

Amplifikasyon: 95 °C’de 10 saniye, 60 °C30 saniye, 72 °C1 saniye

Soğutma: 40 °C’de 30 saniye şeklindedir (Saiki vd. 1988, Guney vd. 2007).

### **3.2.11 Protein miktar tayini**

Western blotta kullanılacak hücre lizatların protein ölçümü, Protein Ölçüm Reaktifi (Biorad, ABD) kullanılarak yapıldı. Protein standartı hazırlanması: 1,49 mg/ml BSA ana stoğu hazırlandı.

Final protein konsantrasyonları:

Standart 1 (497 µg/ml)

Standart 2 (298 µg/ml)

Standart 3 (75 µg/ml)

Standart 4 (50 µg/ml)

Blank olacak şekilde standartlar hazırlandı.

96 kuyucuk plağa her standarttan ve örneklerden ikişer defa 10 µl konularak üzerine 200 µl reaktif boyadan eklendi ve 3 saniye kadar çalkalayıcıda plak çalkalandı. Daha sonra 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilip 620 nm’de spektrofotometrede (Anthos Labtec Instruments, Avusturya) de okutuldu (Duhamel vd. 1981).

### **3.2.12 Protein düzeylerinin western blot yöntemi ile belirlenmesi**

Kanser hücreleri ile ko-kültürü yapılan ve kanser hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyeri uygulanan AT2 hücreleri 24. saat sonra PBS ile yıkandıktan sonra buz üzerinde lizat solüsyonu kullanılarak (Cell Signaling, ABD) lizis edildi. 16.000 RPM’da 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant toplandı. Daha sonra lizatların



protein miktar tayini yapıldı ve kuyucuk başına 5 -20 µg/ml toplam protein miktarı hesaplandı. Protein ve 4X örnek tamponu 95 °C'de 5 dakika kuru ısıtıcıda kaynatıldı.

% 10'luk SDS-PAGE jeli hazırlandı. Jel aparata (Hofer, ABD) döküldükten sonra hava ile temasının kesilmesi ve pürüzsüz bir şekilde polimerize olması için üzerine distile su eklendi ve 30 dakika bekletildi. Üstündeki distile su alınıp kurutma kağıdı ile iyice uzaklaştırıldıktan sonra % 4'lik yayma (stacking) jel döküldü ve onlu tarak yerleştirildi.

Yayma jel polimerize olduktan sonra kaynatılmış örnekler hesaplanan miktarlarda yüklendi. İlk 15 dakika 100V'da daha sonrasında 120 V'da yaklaşık 1,5 saat yürütüldü.

Transfer için jelin boyutlarında PVDF membran (Schleicher ve Schuell, Almanya) kesildi ve metanolde ıslatıldı. Transferde kullanılacak kağıtlar 1X Transfer Tamponunda ıslatıldı. Sırasıyla 2 adet kağıt, membran, jel ve yine 2 adet kağıt konuldu. Transfer aparatında (Hofer, ABD) 65 V'da 90 dakika yürütüldü (Shapiro vd. 1967).

Transferden çıkan membran western blot bloklama tamponuna kondu ve 90 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

Bu aşamada, diğer aşamalarda olduğu gibi yıkamalar western blot yıkama tamponu ile 3 kez 5'er dakika şeklinde yapıldı. Yıkamadan sonra membran, primer antikora kondu ve gece boyunca 4 °C'da inkübe edildi. Muamele edilen antikora bağlı olarak primer ve sekonder antikorların farklı dilüsyonları uygulandı.

Ertesi gün yıkama yapıldıktan sonra membran, sekonder antikor ile 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkamadan sonra HRP substratı olan peroksidaz reaktifi ve ışımaya sağlayan luminol reaktifi (Thermo Scientific, ABD) 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra membranın üstüne döküldü ve 1 dakika beklendi. Daha sonra görüntüleme yapmak için FlourChem Q (Cell Bioscience, ABD) cihazı kullanıldı (Burnette 1981).

**Primer Antikorlar:** Beta-Aktin (Sigma, ABD) western bloklama tamponu içinde 1/40000,  $\alpha$ -ENaK (Thermo Scientific, ABD) % 3.5 western bloklama tamponu içinde 1/1000,  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz (Upstate biotec., ABD) western yıkama tamponu 1/500 oranında dilüsyonu yapıldı.

**Sekonder Antikorlar:** Beta-Aktin ve  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz mouse monoklonal kökenli oldukları için anti-mouse sekonder antikor (Amersham Pharmacia Biotech, İngiltere) kullanıldı. Beta-Aktin için western bloklama tamponu içinde 1/40.000 oranında dilüsyon,  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz için ise western yıkama tamponu içinde 1/2000 dilüsyon oranında yapıldı.  $\alpha$ -ENaK rabbit poliklonal kökenli oldukları için anti-rabbit sekonder antikor (Amersham Pharmacia Biotech, İngiltere) kullanıldı. Western bloklama tamponu içinde 1/1000 oranında dilüsyon yapıldı.

### **3.2.12.1 Membrandan antikor uzaklaştırılması (Stripping)**

İlk uygulanan antikorun membrandan uzaklaştırmak için stripping yapıldı. Böylelikle aynı membran üzerinde başka bir antikor kullanılarak farklı bir protein düzeyi tespit edildi. Bu işlem için stripping buffer (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. Membran 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkandı. Sonrasında stripping buffer ile 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Stripping buffer döküldükten sonra tekrar 3 defa 5 dakika TBS-T ile yıkandı. Bu işlemden sonra bloklama aşamasına geçirildi ve 60 dakika süt tozu ile inkübe edildi. Daha sonra yukarıda anlatılan western blottaki aşamalar takip edildi ve yeni bir antikor kullanıldı (Yeung ve Stanley 2009).

### **3.2.13 Verilerin değerlendirilmesi**

Tüm istatistiksel hesaplamalar SigmaStat 3.5 (Systat Software, ABD) bilgisayar programı ile yapıldı. Çalışmada elde edilen bulgulardan parametrik dağılıma sahip olan gruplar, aralarında anlamlı fark olup olmaması açısından tek yönlü ANOVA ile kontrol edildi. Anlamlı fark olan gruplar arasındaki ikili inceleme Holm-Sidak method ile yapıldı. Nonparametrik dağılımı olan bulgular için ise Kruskal-Wallis testi, grupların

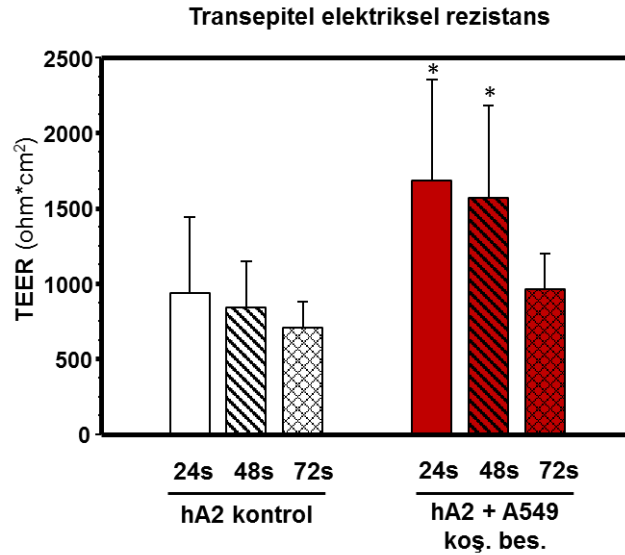
birbirleriyle kıyaslamasında ise Dunn's Method kullanılmıştır. Çalışmada  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve sonuçlar ortalama  $\pm$ SD olarak verildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 A549 Adenokarsinom Hücre Serisi ve AT2 Hücreleri ile Yapılan Deneysel Bulguları

#### 4.1.1 AT2 ile A549 koşullandırılmış besiyeri bulguları

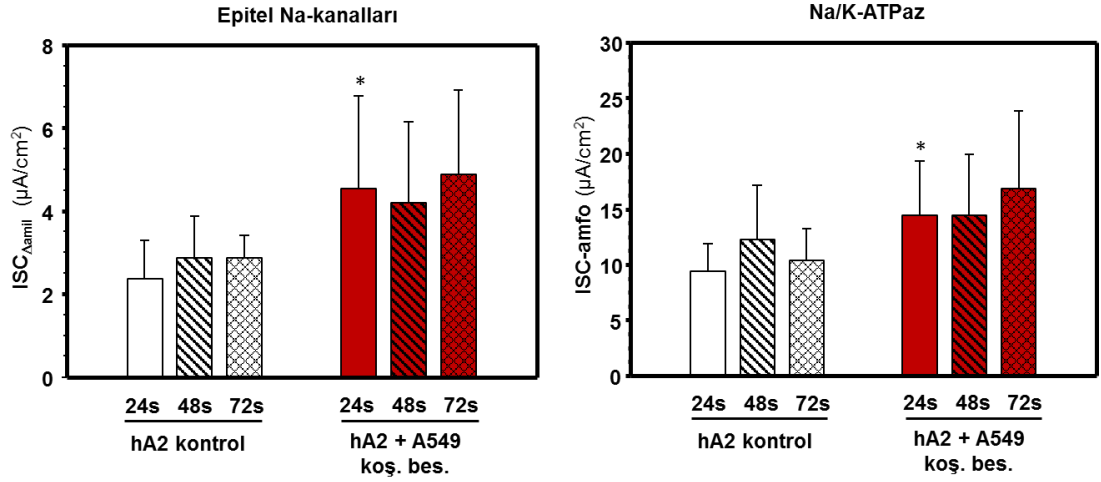
Akciğer operasyonu geçirmiş hastaların patolojik tarafından sağlıklı olduğu onaylanan akciğer doku örnekleri alınarak primer insan AT2 hücre izolasyonu yapıldı. Adenokarsinoma kanser hücresi olarak A549 hücre serisi ile izole edilen sağlıklı AT2 hücreleri deneylerde kullanıldı. A549 koşullandırılmış besiyeri, AT2 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat aralıklarla muamele edildi. Bu deney sürecinde 24., 48. ve 72. saat sonunda Transepitel elektriksel rezistans (TEER) ölçümü ve Na<sup>+</sup> iyon transport (Ussing düzeneği ile) ölçümü yapıldı. Bulgulara göre; A549 koşullandırılmış besiyerine maruz bırakılan AT2 hücreleri, alveolar bariyer gerginliği belirteci olan TEER’de ve Na<sup>+</sup> iyon transportunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir (p<0.001) (Şekil 4.1-4.2).



Şekil 4.1 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

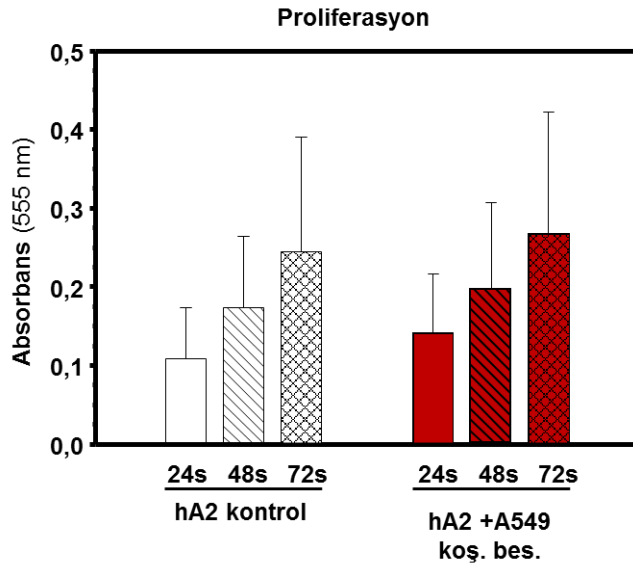
(\*) p<0.001 Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=12)



Şekil 4.2 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)  
 (\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=12)

A549 koş. bes.'nin AT2 hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin olup olmadığını anlamak için Kristal Viyole boyası kullanılarak proliferasyon deneyi yapıldı. 96'lık plate kuyucuklarına 20.000 AT2 hücresi ekildi ve 24., 48. ve 72. saat aralıklar ile A549 koş. bes. uygulandı. A549 koş. bes.'ne maruziyetinin AT2 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği gözlemlendi (Şekil 4.3).

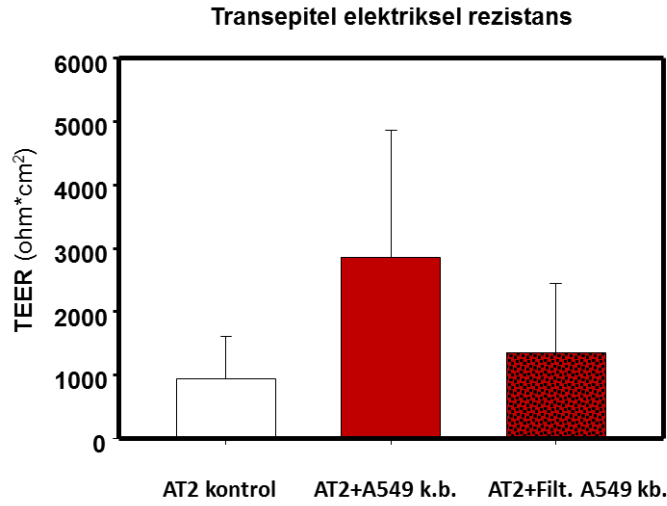


Şekil 4.3 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin proliferasyonuna etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=4)

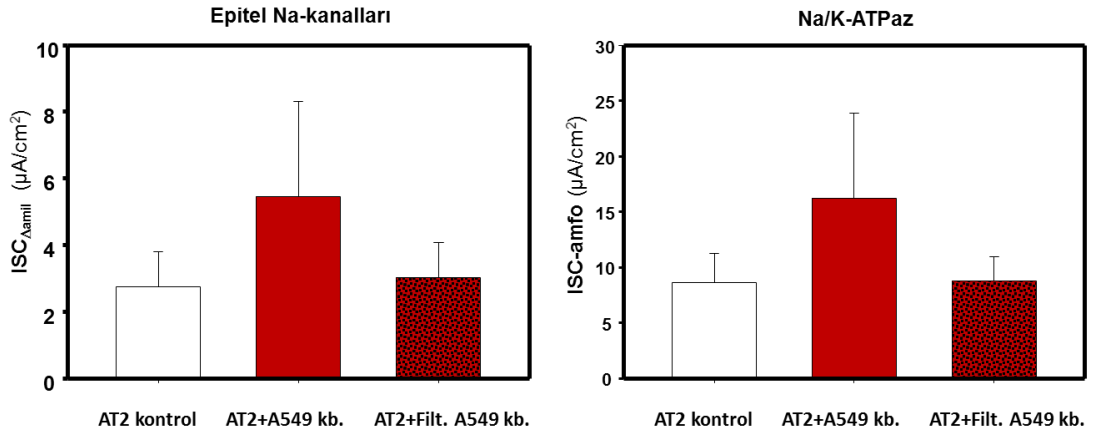
**A549 koş. bes.'in AT2 hücrelerinin alveolar bariyer gerginliğini ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunu nasıl arttırdığını anlayabilmek için çeşitli deneyler yapıldı.**

**Bunlardan birincisi;** koşullandırılmış besiyeri içerisindeki çözünür faktörler, moleküler ağırlığına göre ayrıldı. Bu işlemde 10.000 moleküler ağırlığa kadar molekülleri geçiren filtreler kullanıldı. En iyi etkinin görüldüğü 24. saatte, normal A549 koş. bes. ve filtrelenmiş (moleküler ağırlığı 10.000'den küçük olan molekülleri içeren) A549 koş. bes. AT2 hücrelerine uygulandı. Filtrelenmiş A549 koş. bes. AT2 hücrelerinde alveolar bariyer gerginliğinde ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunda bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi (Şekil 4.4-4.5).



Şekil 4.4 A549 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

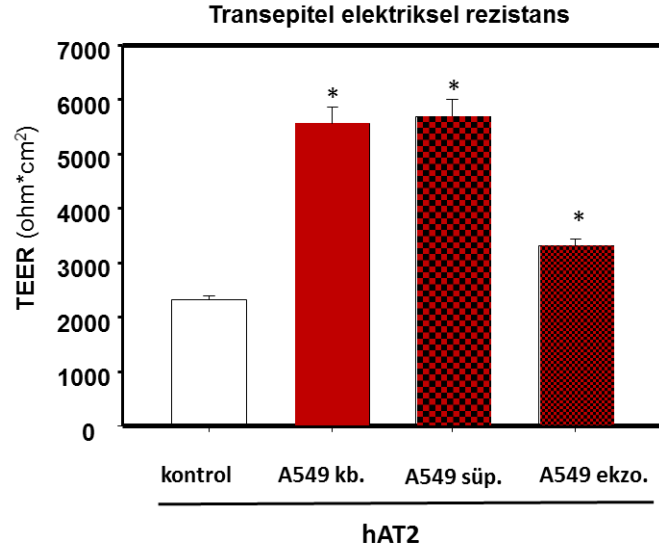
(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=4)



Şekil 4.5 A549 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=4)

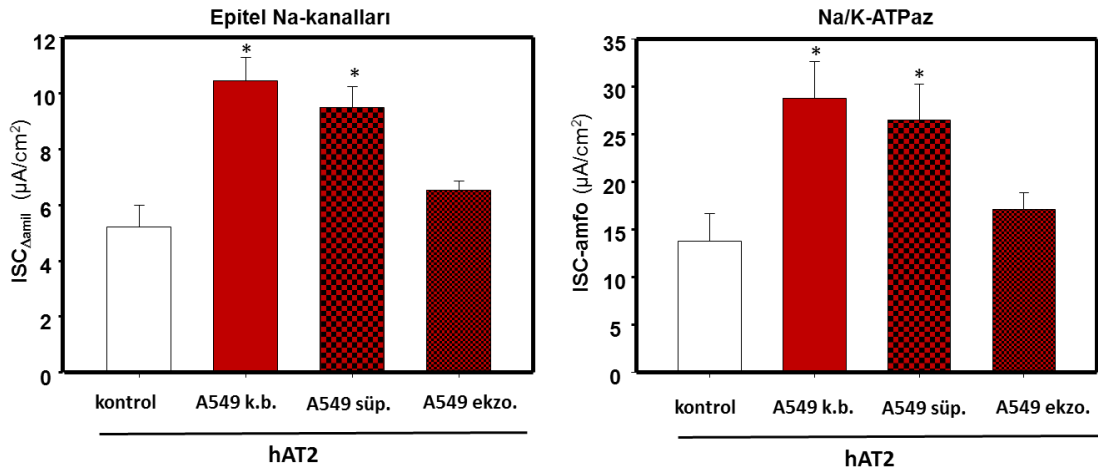
**İkinci olarak;** hücrelerden salgılanan ve diğer hücelere ulaşarak o hücrede faaliyet gösterebilen ekzozomların, koşullandırılmış besiyerlerinden izole edilerek aktivitesine bakıldı. Alveolar bariyer gerginliği ve Na<sup>+</sup>-iyon transportu üzerine etkisinin ölçülmesi için A549 koş. bes.'den izole edilen ekzozomlar, A549 koş. bes. ve ekzozomları uzaklaştırılmış A549 süpernatant (A549 süp.) ile AT2 hücreleri 24. saat süre ile muamele edildi. Ekzozomların, A549 koş. bes.'in ve A549 süp.'in AT2 hücrelerinde alveolar bariyer gerginliğini arttırdığı görülmektedir (p<0.001) (Şekil 4.6). Ekzozomlar Na<sup>+</sup>-iyon transportunda bir değişikliğe neden olmazken A549 koş. bes. ve A549 süp.'in Na<sup>+</sup>-iyon transportunu arttırdığı gözlenmektedir (p<0.001) (Şekil 4.7).



Şekil 4.6 A549 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=4)



Şekil 4.7 A549 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=4)



**Üçüncü olarak;** A549 hücrelerinin salgıladığı moleküllerden HGF, VEGF, MCP-1, ICAM-1 ve Angiopoitein-2'nin düzeyinin belirlenmesi için A549 koş. bes. Luminex yöntemi ile ölçüldü. A549 koş. bes.'de HGF ve Angiopoietin-2 molekülleri tespit edilemezken VEGF, ICAM-1 ve MCP-1 molekülleri aşağıdaki düzeylerde belirlendi (Çizelge 4.1).

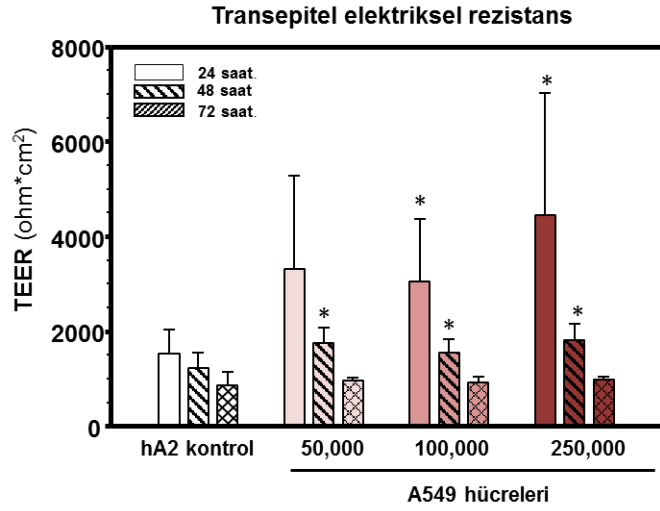
Çizelge 4.1 A549 koşullandırılmış besiyerinin içerdiği bazı moleküller

	Moleküller				
	Angioprotein-2 (pg/ml)	ICAM-1 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
A549 koş. bes.		40,7±36,9	5541,83±4691,86		338,2±296,15

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3)

#### 4.1.2 AT2 ile A549 hücresi ko-kültür bulguları

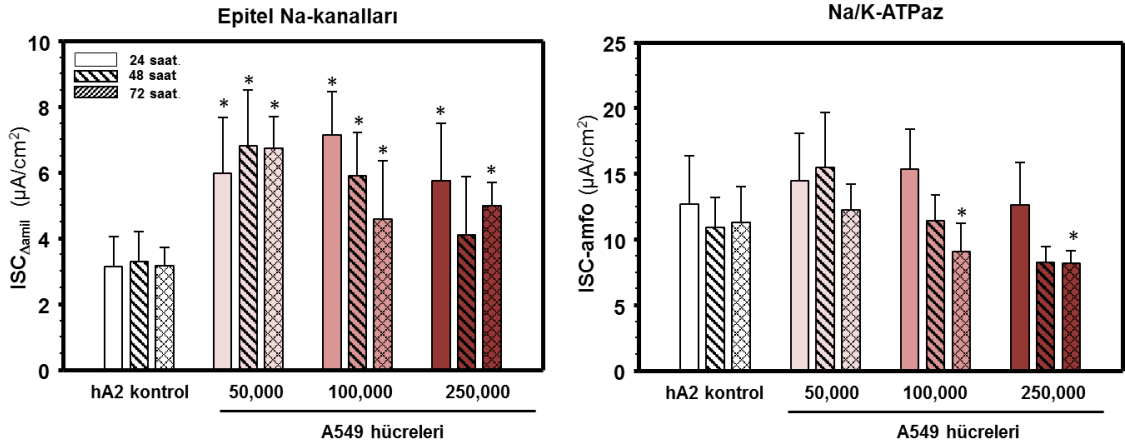
A549 hücreleri ve sağlıklı dokudan izole edilen AT2 hücrelerinin 24., 48. ve 72. saat süre aralıkları ile ko-kültürü yapıldı. A549 hücreleri sırası ile 50.000, 100.000 ve 250.000 olan üç farklı hücre yoğunluğuna göre ekildi. Bu deney sürecinde 24., 48. ve 72. saat sonunda Transepitel elektriksel rezistans (TEER) ölçümü ve Na<sup>+</sup>-iyon transport ölçümü yapıldı. Ko-kültür deney sonuçlarına göre; AT2 ile A549 hücre ko-kültürü TEER ve Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesini istatistiksel olarak arttırırken (p<0.001) uzun süre maruziyette azaltmaktadır. AT2 ile A549 ko-kültürü Na/K-ATPaz aktivitesini ise etkilememektedir (Şekil 4.8-4.9).



Şekil 4.8 A549 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=8-14)



Şekil 4.9 A549 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

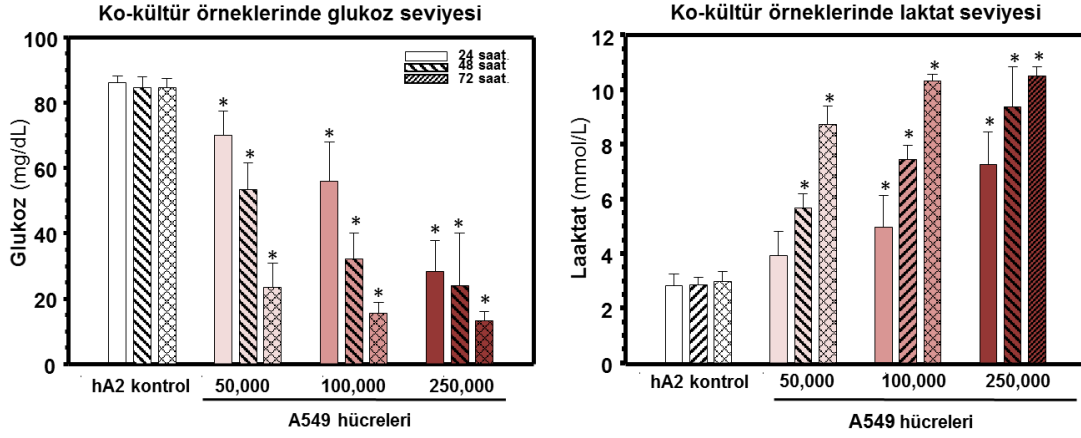
(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=8-14)

#### 4.1.2.1 AT2 ile A549 ko-kültürü metabolik aktivite bulguları

A549 ile AT2 ko-kültürü esnasında metabolik aktiviteyi tespit etmek için deney sürecinde 24., 48. ve 72. saatlerde süpernatant örnekleri alınıp glukoz ve laktat düzeyleri

ölçülmüştür. AT2 ile A549 ko-kültürün kültür besiyerindeki glukoz seviyesi azalırken laktat seviyesi artmaktadır ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri

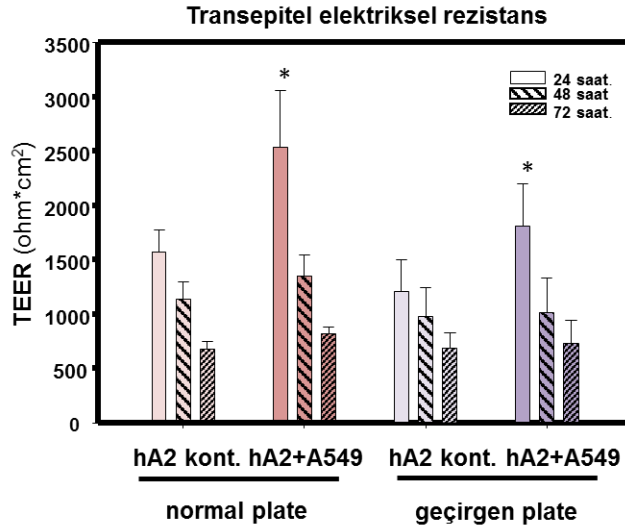
(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı ( $n=8-14$ )

### 4.1.3 AT2 ile A549 geçirgen plate ko-kültür bulguları

A549 ile AT2 ko-kültürü sonuçlarına göre; artan A549 hücre sayısı ile birlikte AT2 hücrelerinin  $\text{Na}^+$ -transportu azalır. Bu durum uzun süreli maruziyet ile daha belirgin olarak görülür. Uzun süreli maruziyet ve artan hücre sayısı ile birlikte azalmış AT2 hücre fonksiyonunun nedenini anlayabilmek için hipoksik ortamı ortadan kaldıran  $\text{O}_2$  geçirgenliği sağlayan özel geçirgen plateler kullanılarak ko-kültür deneyleri tekrarlandı. Bu deneyler için alveolar bariyer gerginliğine ve  $\text{Na}^+$ -transportunda artışa yol açan ve aynı zamanda uzun maruziyet sonucu alveolar bariyer gerginliğine ve  $\text{Na}^+$ -transportunda azalmaya neden olan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan 100.000 A549 hücre sayısı seçildi. Geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültür deney sonuçlarına göre ise; AT2 ile A549 hücre ko-kültürü, her iki plate türünde de alveolar bariyer gerginliğini arttırmaktadır ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.11). Normal plate deneylerinde  $\text{Na}^+$ -kanal aktivitesini artırırken geçirgen plate deneylerinde  $\text{Na}^+$ -kanal aktivitesini etkilememektedir ( $p<0.001$ ).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi normal plate deneylerinde azalma eğiliminde iken, geçirgen platelerde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinde herhangi bir

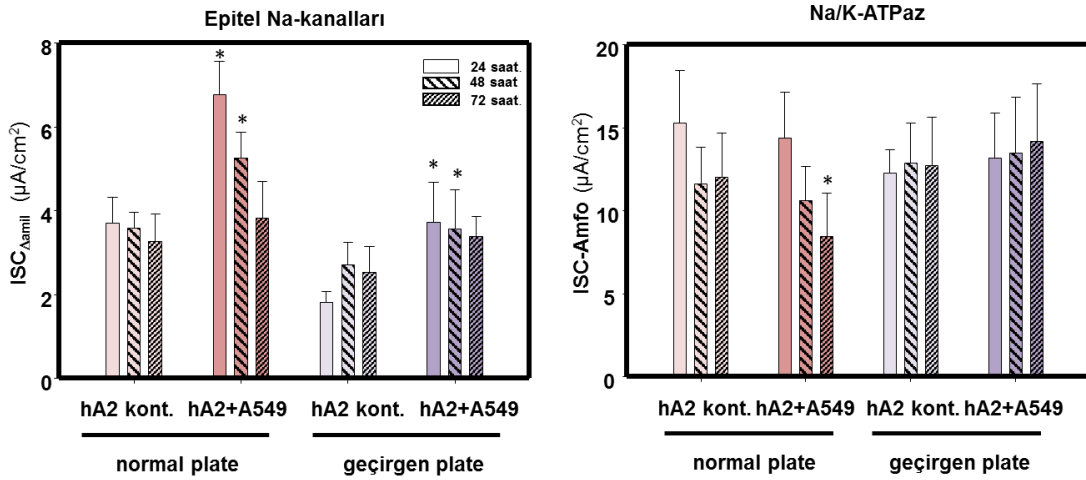
değişim olmamaktadır (Şekil 4.12). Normal platelerde gözlenen bulgular, geçirgen platelerde gözlenmemektedir. Bu bulgular, azalmış AT2 hücre fonksiyonunun  $O_2$  aracılığı ile düzeldiğini göstermiştir.



Şekil 4.11 A549 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=6)



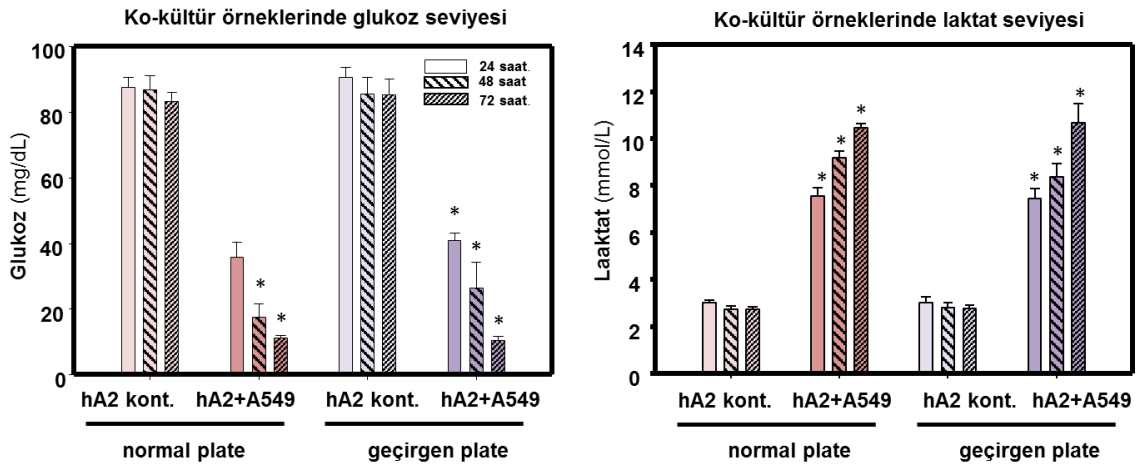
Şekil 4.12 A549 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=6)

#### 4.1.3.1 AT2 ile A549 geçirgen plate ko-kültürü metabolik aktivite bulguları

Metabolik aktivitenin geçirgen platelerde farklılık gösterip göstermediğini anlayabilmek için her iki plate türünde yapılan ko-kültür sürecinde 24., 48. ve 72. saatlerde süpernatant örnekleri alınıp glukoz ve laktat düzeyleri ölçülmüştür. Normal ve geçirgen platelerdeki glukoz tüketimi ve laktat üretimi arasında fark yoktur (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

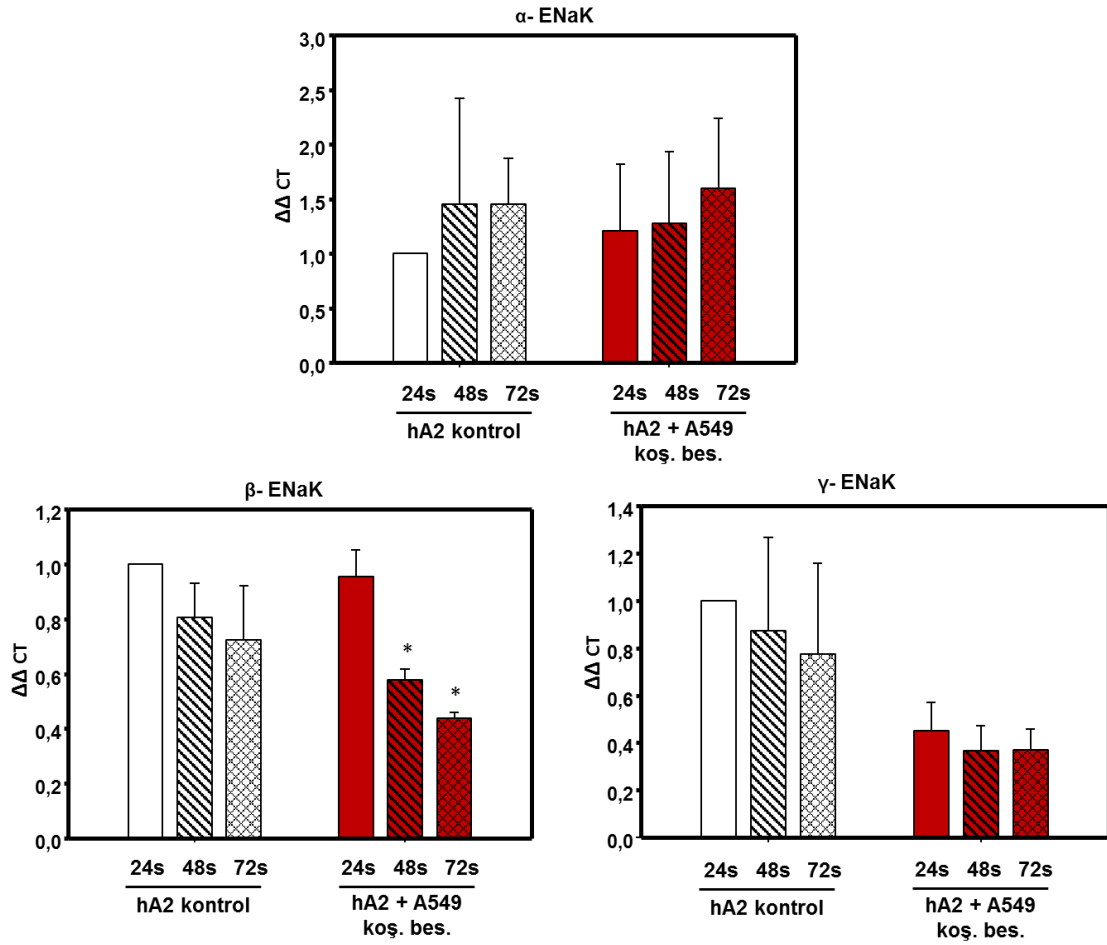
(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=6)

#### 4.1.4 A549 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları

##### 4.1.4.1 A549 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları

AT2 hücrelerin A549 koş. bes. ile muamele edilmesi sonucunda  $\text{Na}^+$  transportu ile  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz 24. saatte istatistiksel olarak anlamlı artış göstermektedir. Bu etkiyi mRNA düzeyinde araştırmak için AT2 ve A549 koş. bes. deney örneklerinden RNA izole edildi. ENaK'ın alt üniteleri olan  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  alt üniteleri ve Na/K-ATPaz'ın alt ünitesi olan  $\alpha 1$ -Na/K-ATPaz, RT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyi ölçüldü. AT2 ile A549 koş. Bes ile muamele edilmesi,  $\alpha$ -ENaK alt ünitesinin mRNA ekspresyonlarında bir

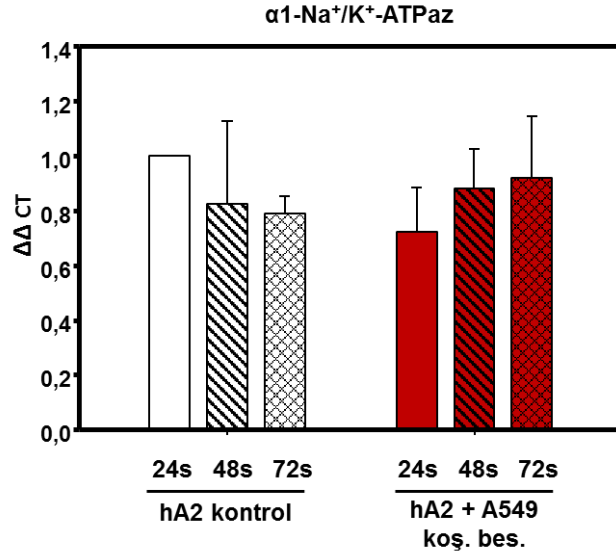
değişime neden olmamaktadır.  $\beta$ -ENaK alt ünitesinin mRNA ekspresyonları ise 48. ve 72. saatte azalmaktadır ( $p<0.05$ ).  $\gamma$ -ENaK alt ünitesi mRNA ekspresyonunda kontrol ve A549 koş. bes. örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmektedir ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.14).  $\alpha$ -Na/K-ATPaz'ın mRNA ekspresyonuna bakıldığında ise herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$  alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.05$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=3)

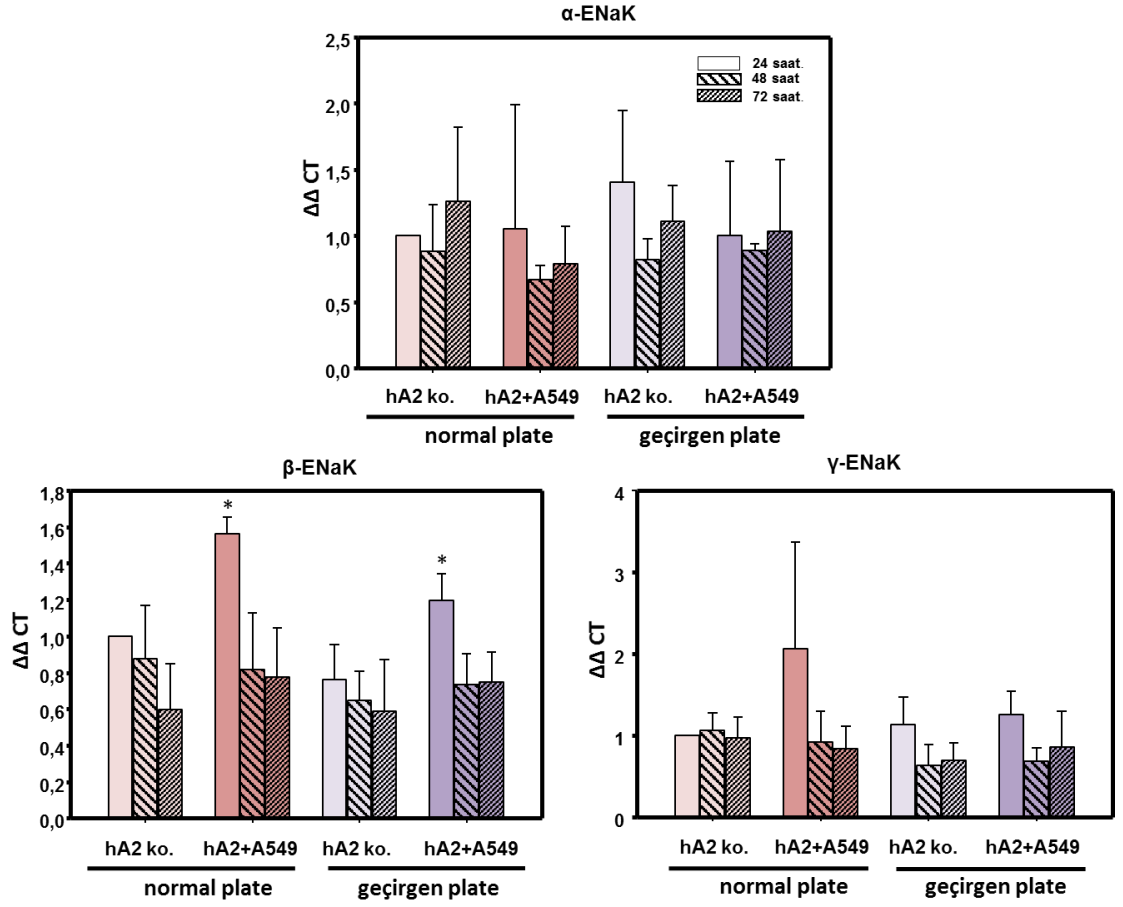


Şekil 4.15 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin  $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3).

#### 4.1.4.2 A549 ile AT2 yapılan ko-kültür mRNA ekspresyon bulguları

Daha önceden de belirtildiği gibi normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan A549 ile AT2 ko-kültürü, normal plate deneylerinde Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesini arttırırken geçirgen plate deneylerinde Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesini etkilememektedir. Bu etkinin mRNA düzeyinde ekspresyonuna bakmak için normal ve geçirgen plate örneklerinden RNA izole edilerek epitel Na<sup>+</sup>-kanallarının (ENaK) alt üniteleri ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ) RT-PCR yöntemi ile ölçüldü. AT2 ile A549 hücre ko-kültürü, her iki plate türünde  $\alpha$ -ENaK alt ünitenin mRNA ekspresyonlarında bir değişime neden olmamaktadır.  $\beta$ -ENaK alt ünitenin mRNA ekspresyonları her iki plate türü ile yapılan deneylerde 24. saatte artmaktayken ( $p < 0.001$ ), uzun süreli uygulamada etki görülmemektedir.  $\gamma$ -ENaK alt ünite mRNA ekspresyonunda normal plate 24. saat örneklerinde artmış gibi görülse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.16).



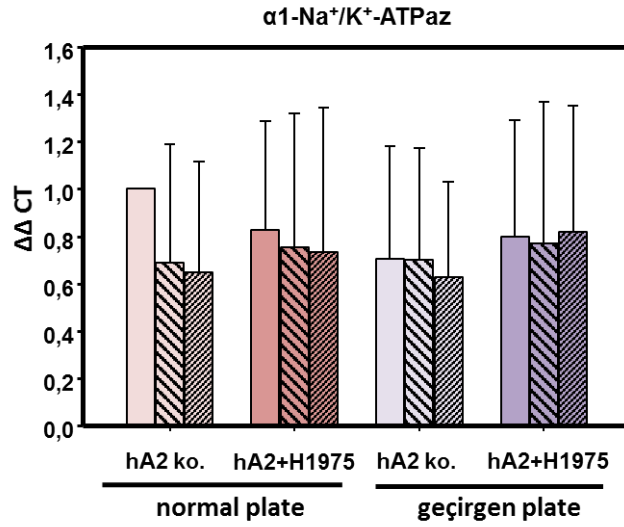
Şekil 4.16 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin α-ENaK, β-ENaK ve ENaK-γ alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular ±SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=3)

Normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan A549 ile AT2 ko-kültürü Na/K-ATPaz aktivitesi normal plate deneylerinde azalma eğiliminde iken geçirgen platelerde Na/K-ATPaz aktivitesinde bir değişim gözlenmediği daha önceden belirtilmişti. Bu etkinin α1-Na/K-ATPaz'ın mRNA ekspresyonuna bakıldığında her iki plate türünde de bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.17).



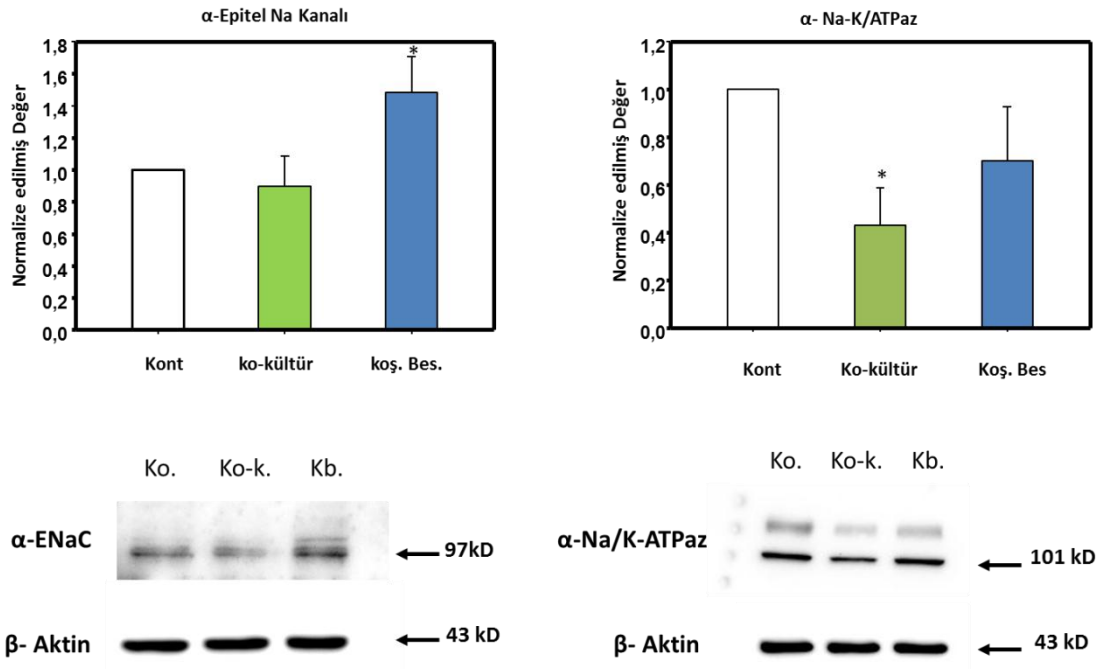


Şekil 4.17 AT2 ile A549 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin  $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

#### 4.1.5 A549 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin protein ekspresyon bulguları

Temel deney protokolüne bağlı kalınıp primer insan AT2 hücre izolasyonu yapıldı. A549 koş. bes. AT2 hücreleri ile 24 saat muamele edildi. Aynı zamanda A549 ile AT2 hücrelerin 24 saat ko-kültürü yapıldı. 24 saat sonunda hAT2 hücreleri lizis edildi ve protein miktarları ölçüldü. Bu örneklerle  $\alpha$ -Epitel sodyum kanalı ( $\alpha$ -ENaK),  $\alpha$ -Na/K-ATPaz ve internal kontrol (housekeeping control) olarak  $\beta$ -Aktinin protein ekspresyonu western blot ile ölçüldü. Sonuçlara göre; A549 koş. bes.'e maruz bırakılan AT2 hücrelerinin  $\alpha$ -ENaK protein ekspresyonunun arttığı gözlemlenmektedir ( $p < 0.05$ ). Diğer taraftan AT2 ile A549 ko-kültürü,  $\alpha$ -ENaK protein ekspresyonu etkilememektedir. A549 koş. bes.'e maruz bırakılan AT2 hücrelerinin  $\alpha$ -Na/K-ATPaz protein ekspresyonunda belirgin bir değişim gözlenmezken A549 hücreleri ile ko-kültürü yapılan AT2 hücrelerinin  $\alpha$ -Na/K-ATPaz protein ekspresyonunda protein ekspresyonu azalmaktadır ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.18).



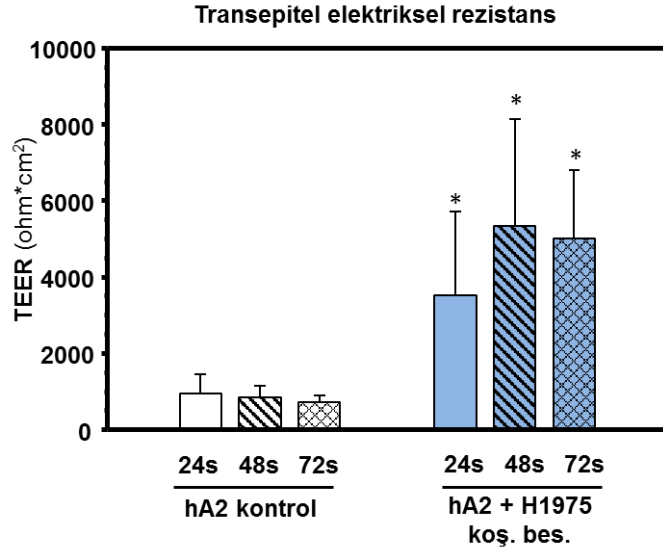
Şekil 4.18 AT2 ile A549 koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin  $\alpha$ -ENaK ve  $\alpha$ 1-Na-K/ATPaz protein ekspresyonu (Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.05$  Kontrol grubuna göre anlamlı (n=3-4)

## 4.2 H1975 Adenokarsinom Hücre Serisi ve AT2 Hücreleri ile Yapılan Deney Bulguları

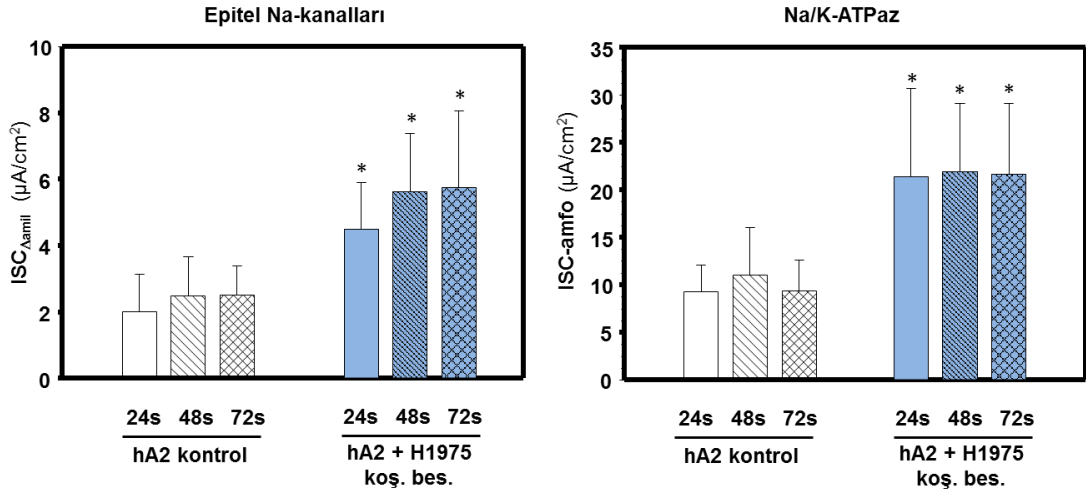
### 4.2.1 AT2 ile H1975 koşullandırılmış besiyeri bulguları

Akciğer operasyonu geçirmiş hastaların patoloğ tarafından sağlıklı olduğu onaylanan akciğer doku örnekleri alınarak primer AT2 hücre izolasyonu yapıldı. Bu sefer deneylerde adenokarsinoma kanser hücresi olarak H1975 hücre serisi ile izole edilen sağlıklı AT2 hücreleri kullanıldı. H1975 koşullandırılmış besiyeri (H1975 Koş. bes.), AT2 hücreleri ile 24, 48 ve 72 saat aralıklar ile muamele edildi. Bu deney sürecinde 24., 48. ve 72. saat sonunda Transepitel elektriksel rezistans (TEER) ölçümü ve  $\text{Na}^+$ -iyon transport (Ussing düzeneği ile) ölçümü yapıldı. Elde ettiğimiz bulgulara göre; H1975 koş. bes. maruz bırakılan AT2 hücrelerinin alveolar bariyer gerginliği ve  $\text{Na}^+$ -iyon transportu artmaktadır ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.19-4.20).



Şekil 4.19 H1975 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)  
 (\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=14)

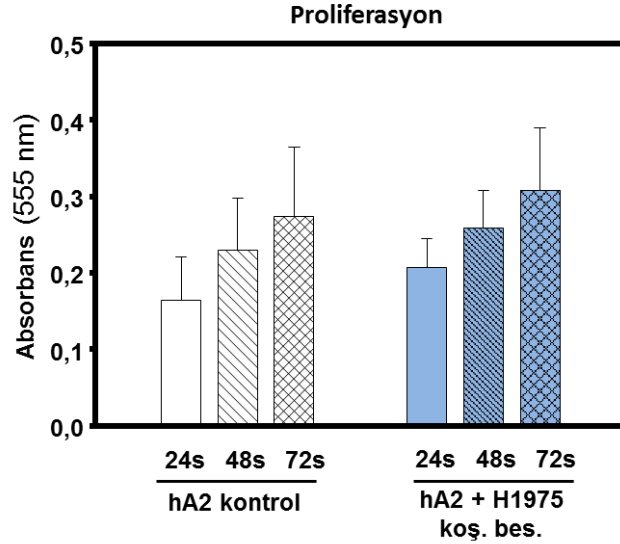


Şekil 4.20 H1975 koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)  
 (\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=14)

H1975 koş. bes.'nin AT2 hücrelerinin çoğalması üzerine etkisinin olup olmadığını anlamak için Kristal Viyole boyası kullanılarak proliferasyon deneyi yapıldı. 96'lık plate kuyucuklarına 20.000 AT2 hücresi ekildi ve 24., 48. ve 72. saat boyunca H1975

koş. bes. uygulandı. H1975 koş. bes. uygulaması AT2 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği tespit edilmiştir (Şekil 4.21).

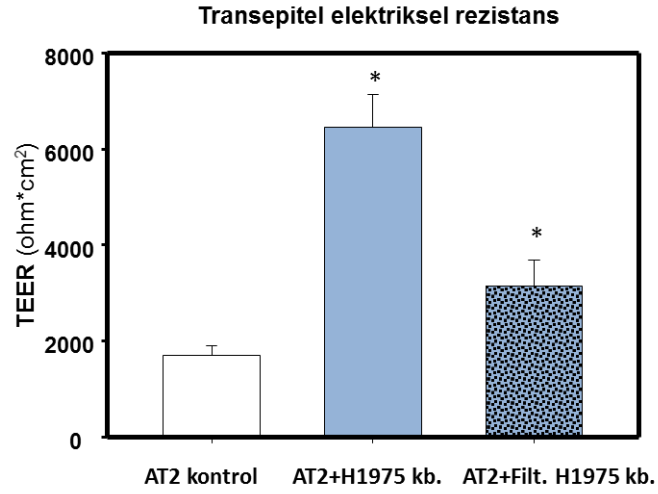


Şekil 4.21 H1975 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

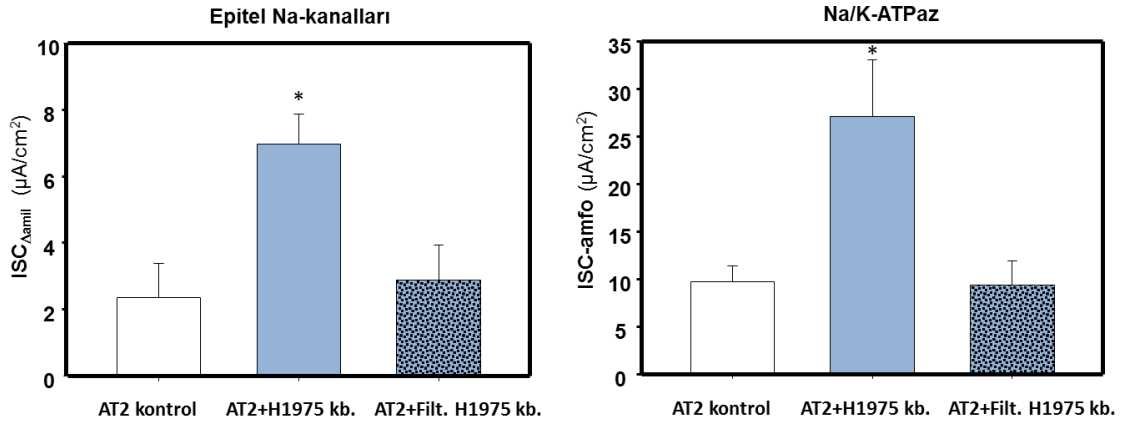
(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=4)

**H1975 koş. bes.’nin AT2 hücrelerinin alveolar bariyer gerginliğini ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunu nasıl arttırdığını anlayabilmek için çeşitli deneyler yapıldı.**

**Birinci olarak;** H1975 koş. bes. içerisindeki çözünür faktörler moleküler ağırlığına göre ayrıldı. Bu deneyde, daha önceden A549 koş. bes.’ne yapılan aynı filtrasyon işlemi uygulandı. Filtrasyon için 10.000 moleküler ağırlığa kadar molekülleri geçiren filtreler kullanıldı. Normal H1975 koş. bes. ve filtrelenmiş (moleküler ağırlığı 10.000’den küçük olan molekülleri içeren) H1975 koş. bes. AT2 hücrelerine 24 saat boyunca uygulandı. Filtrelenmiş H1975 koş. bes. AT2 hücrelerinde TEER’de istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.22) filtrelenmiş H1975 koş. bes. AT2’nin Na<sup>+</sup>-iyon transportunda bir değişikliğe neden olmamaktadır (Şekil 4.23).



Şekil 4.22 H1975 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi  
(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=4)

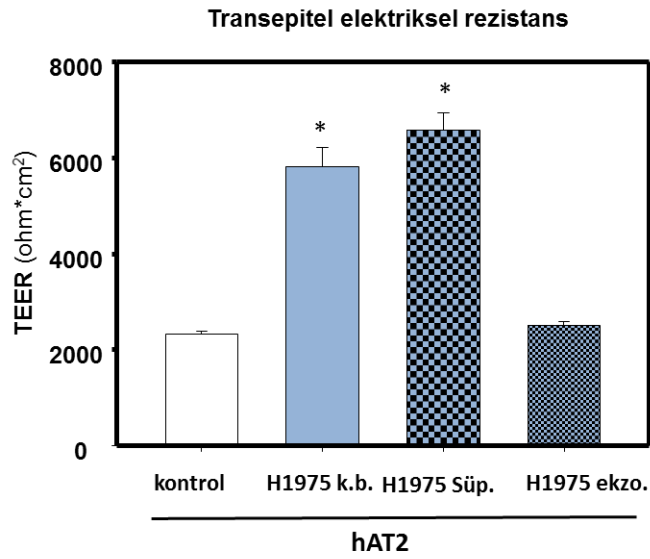


Şekil 4.23 H1975 filtrelenmiş koşullandırılmış besiyeri uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=4)

**İkinci olarak;** Bu etkinin nedeninin koşullandırılmış besiyerinin içerdiği ekzozomlardan kaynaklanıp kaynaklanmadığını anlamak için koşullandırılmış besiyerlerinden ekzozom izole edildi. Ekzozomlar, H1975 koş. bes. ve ekzozomları uzaklaştırılmış H1975 süpernatant (H1975 süp.) ile AT2 hücreleri 24 saat süre ile

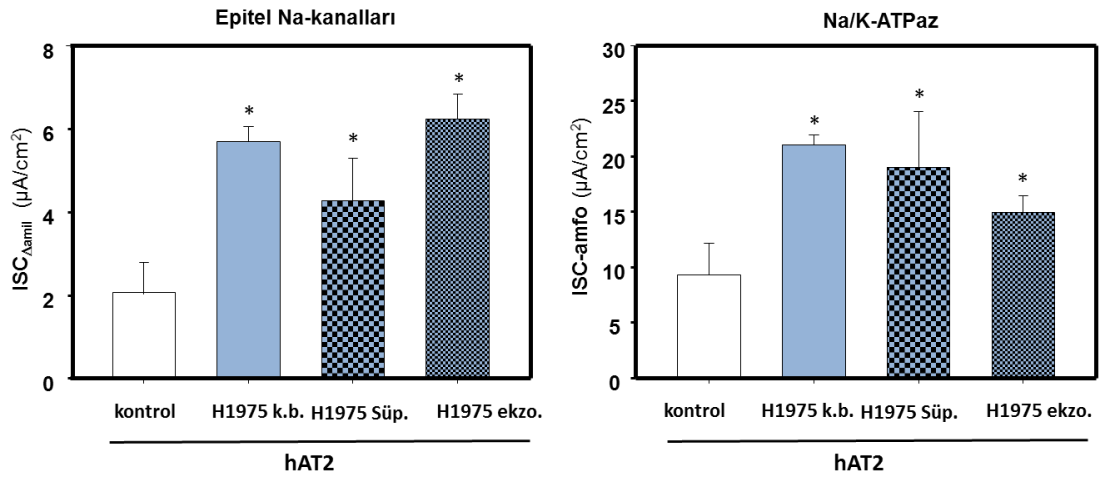
muamele edildi. H1975 koş. bes. ve H1975 sp.'ın AT2 hücrelerinde alveolar bariyer gerginliğini arttırırken ( $p<0.001$ ) ekzozomlar alveolar bariyer gerginliğini etkilememektedir (şekil 4.24). H1975 koş. bes., H1975 sp. ve ekzozomlar'ın AT2'nin  $Na^+$ -iyon transportunu arttırdığı gözlenmektedir ( $p<0.001$ ). Fakat ekzozomlar, H1975 koş. bes ve H1975 sp. ile kıyaslandığında birbirlerine göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir (şekil 4.25).



şekil 4.24 H1975 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) zerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=4)



Şekil 4.25 H1975 ekzozom uygulanmasının AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=4)

**Üçüncü olarak;** kanser hücrelerinin salgıladığı moleküllerden HGF, VEGF, MCP-1, ICAM-1 ve Angiopoitein-2'nin düzeyinin belirlenmesi için H1975 koş. bes. Luminex yöntemi ile ölçüldü. H1975 koş. bes.'de VEGF, ICAM-1 ve MCP-1 molekülleri aşağıdaki tablodaki düzeylerde tespit edilirken HGF ve Angiopoietin-2 molekülleri tespit edilemedi (Çizelge 4.2).

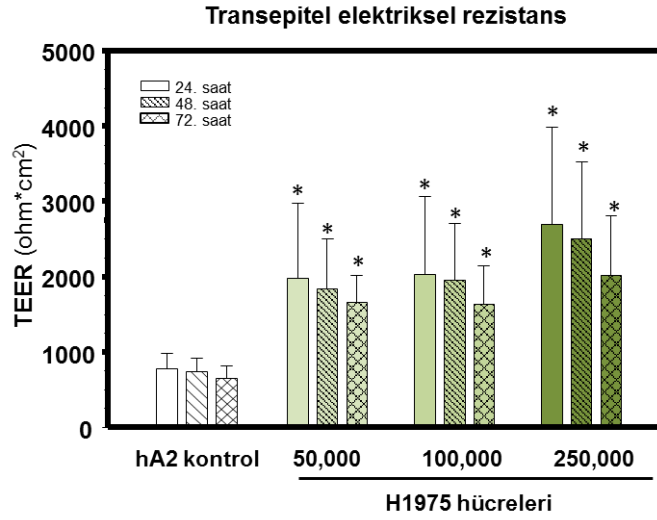
Çizelge 4.2 H1975 koşullandırılmış besiyerinin içerdiği bazı moleküller

	Moleküller				
	Angioprotein-2 (pg/ml)	ICAM-1 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	HGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)
H1975 koş. bes.	-	706,1 $\pm$ 403	3714 $\pm$ 3732,5	-	4263,8 $\pm$ 3155,6

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3)

#### 4.2.2 AT2 ile H1975 hücresi ko-kültür bulguları

H1975 hücreleri ve sağlıklı dokudan izole edilen AT2 hücrelerin 24., 48. ve 72. saat süre aralıkları ile ko-kültürü yapıldı. H1975 hücreleri sırası ile 50.000, 100.000 ve 250.000 olan üç farklı hücre yoğunluğuna göre ekildi. Bu deney sürecinde 24., 48. ve 72. saat sonunda Transepitel elektriksel rezistans (TEER) ölçümü ve Na<sup>+</sup>-iyon transport ölçümü yapıldı. Ko-kültür deney sonuçlarına göre; AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü, TEER ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunu istatistiksel olarak artırırken uzun süre maruziyetle birlikte bu artışın azalma eğiliminde olduğu görülmektedir (p<0.001) (Şekil 4.26-27).

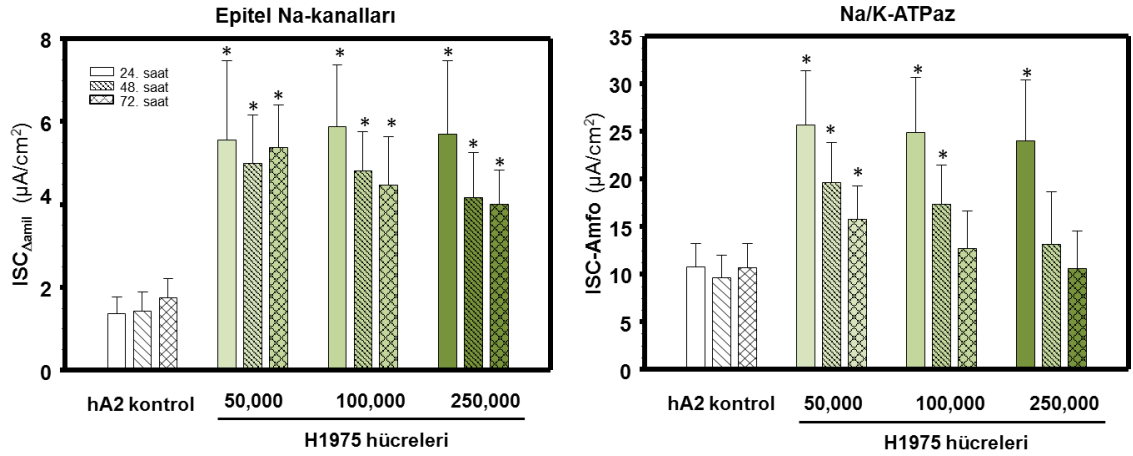


Şekil 4.26 H1975 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*) p<0.001 Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=8-14)





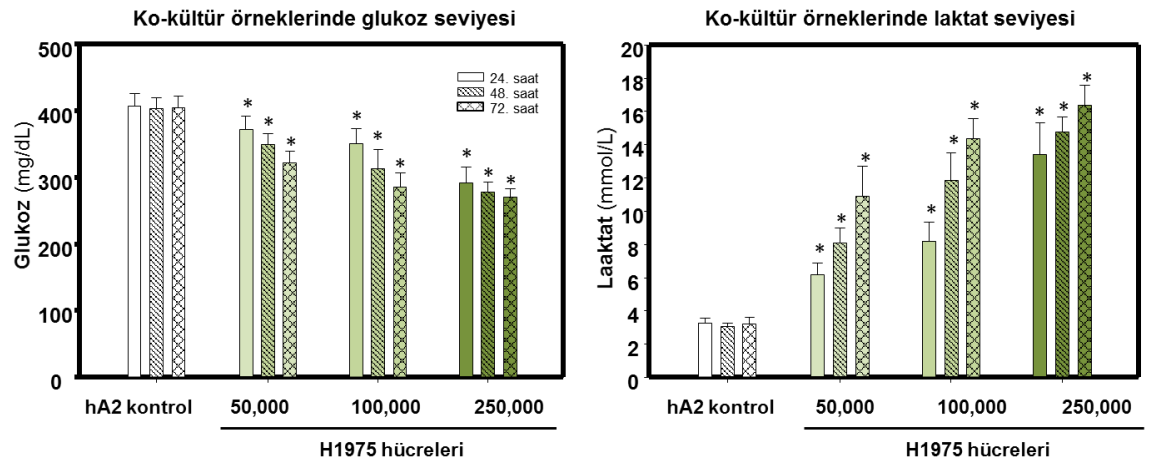
Şekil 4.27 H1975 ile yapılan ko-kültürün AT2 hücrelerinin epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=8-14)

#### 4.2.2.1 AT2 ile H1975 ko-kültürü metabolik aktivite bulguları

H1975 ile AT2 ko-kültürü esnasında metabolik aktiviteyi tespit etmek için deney sürecinde 24., 48. ve 72. saatlerde süpernatant örnekleri alınıp glukoz ve laktat düzeyleri ölçülmüştür. AT2 ile H1975 ko-kültürün kültür besiyerindeki glukoz seviyesinde azalma ve laktat seviyesinde ise artış görülmektedir ( $p<0.001$ ) (Şekil 4.28).



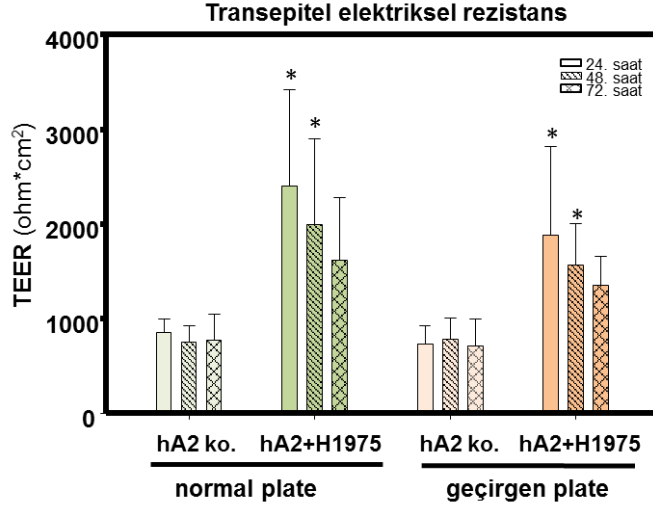
Şekil 4.28 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p<0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=8-14)

### 4.2.3 AT2 ile H1975 geçirgen plate ko-kültürü bulguları

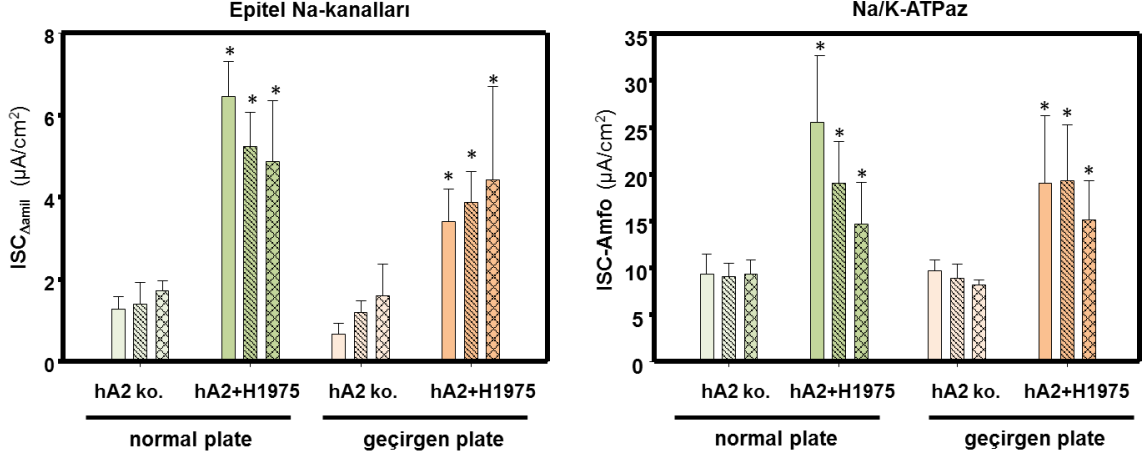
H1975 ile AT2 ko-kültürü AT2 hücrelerinin Na<sup>+</sup>-iyon transportunu arttırmaktadır. Diğer taraftan artan H1975 hücre sayısı ile birlikte AT2 hücrelerinin Na<sup>+</sup>-iyon transportunun azaldığı gözlenmektedir. Bu durum uzun süreli maruziyet ile daha belirgin olarak görülmektedir. A549 ile AT2 ko-kültür deneylerinde olduğu gibi, uzun süreli maruziyet ve artan hücre sayısı ile birlikte azalmış AT2 hücre fonksiyonunun nedenini anlayabilmek için hipoksik ortamı ortadan kaldıran O<sub>2</sub> geçirgenliği sağlayan özel geçirgen plateler kullanılarak ko-kültür deneyleri tekrarlandı. Bu deneyler için alveolar bariyer gerginliğine ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunda artışa yol açan ve aynı zamanda uzun maruziyet sonucu alveolar bariyer gerginliğine ve Na<sup>+</sup>-transportunda azalmaya neden olan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan 100.000 H1975 hücre sayısı seçildi. Geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültür deney sonuçları ise; AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü, her iki plate türünde de TEER aktivitesini arttırmaktayken 72. saat sonunda bu etki kaybolmaktadır (p<0.001) (Şekil 4.29). Normal plate deneylerinde Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesinde artış ve uzun maruziyetle birlikte azalma gözlenirken geçirgen plate deneylerinde Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesinde uzun süreli maruziyet artışı etkilememektedir (p<0.001). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesi normal plate deneylerinde artışın ardından azalma eğiliminde iken geçirgen platelerde Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesinde bir değişime neden olmaz (p<0.001) (Şekil 4.30). Normal platelerde gözlenen bulgular, geçirgen platelerde gözlenmemektedir. Bu bulgular, azalmış AT2 hücre fonksiyonunun O<sub>2</sub> aracılığı ile düzeldiğini göstermiştir.



Şekil 4.29 H1975 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, AT2 hücrelerinin transepitel elektriksel rezistansı (TEER) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=6)



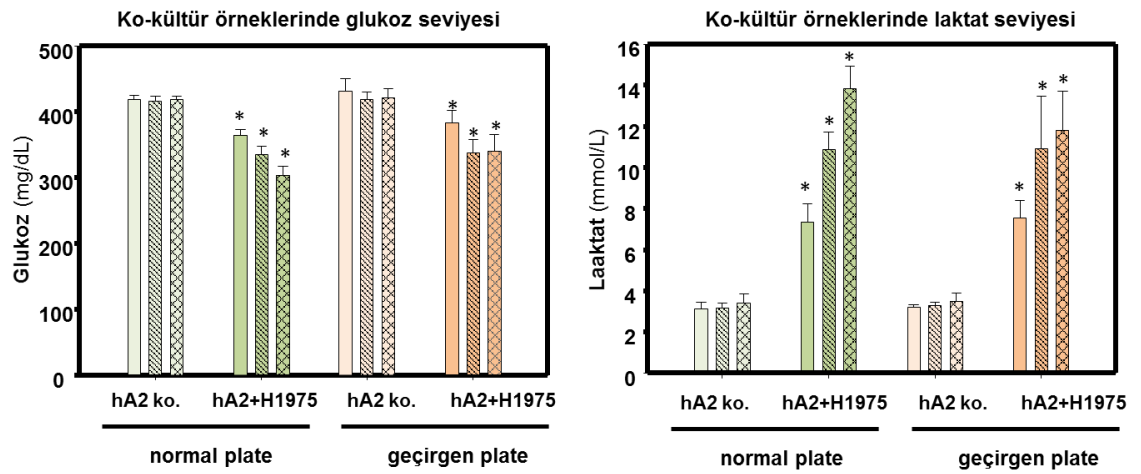
Şekil 4.30 H1975 ile AT2 normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültürün, epitel Na-kanalları (ISC  $\Delta$ amil) ve Na/K-ATPazlar'ı (ISC-amfo) üzerine olan etkisi

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=6)

#### 4.2.3.1 AT2 ile H1975 geçirgen plate ko-kültürü metabolik aktivite bulguları

Metabolik aktivitenin geçirgen platerde farklılık gösterip göstermediğini anlayabilmek için her iki plate türünde yapılan ko-kültür sürecinde 24., 48. ve 72. saatlerde süpernatant örnekleri alınıp glukoz ve laktat düzeyleri ölçülmüştür. Normal ve geçirgen platerdeki glukoz tüketimi ve laktat üretimi neredeyse aynı düzeydedir ( $p < 0.001$ ) (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin glukoz ve laktat seviyeleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

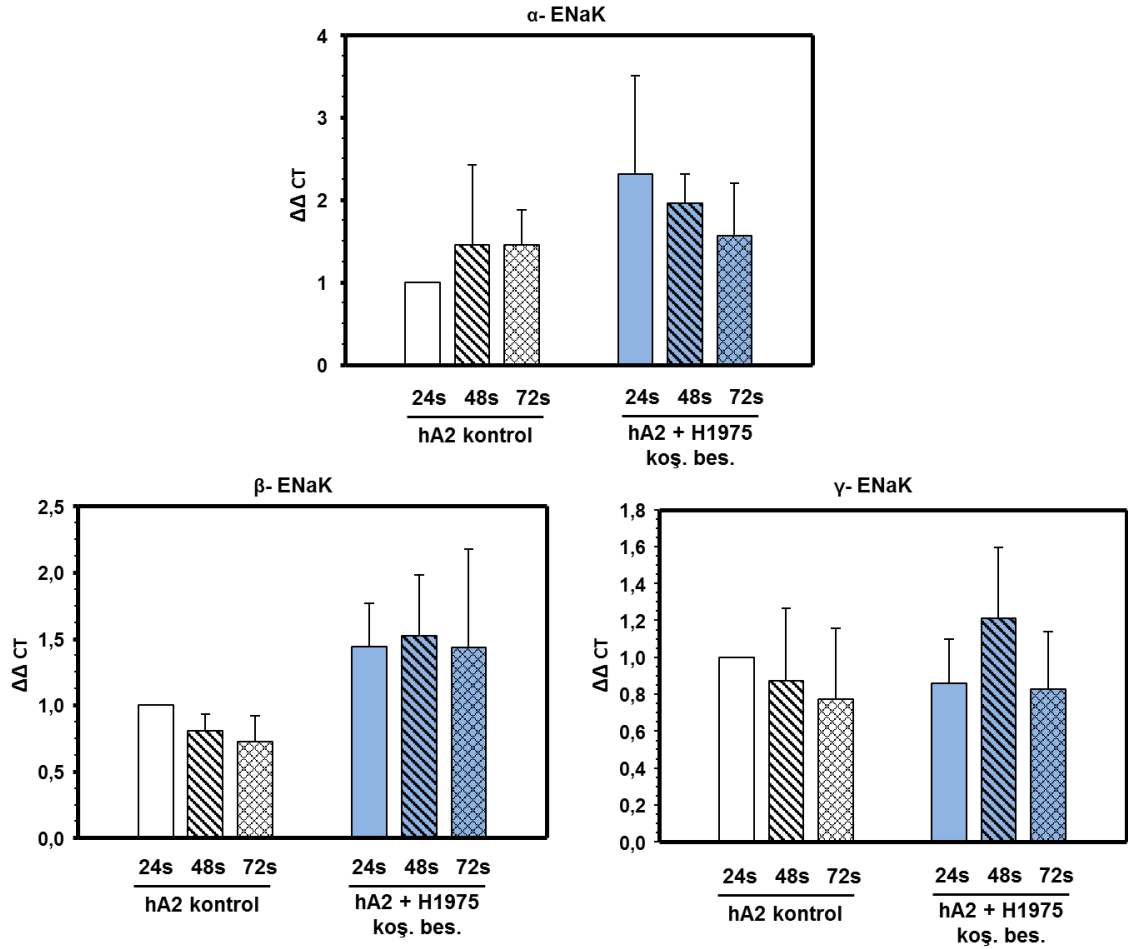
(\*)  $p < 0.001$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı ( $n=6$ )

#### 4.2.4 H1975 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları

##### 4.2.4.1 H1975 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri deneylerinin mRNA ekspresyon bulguları

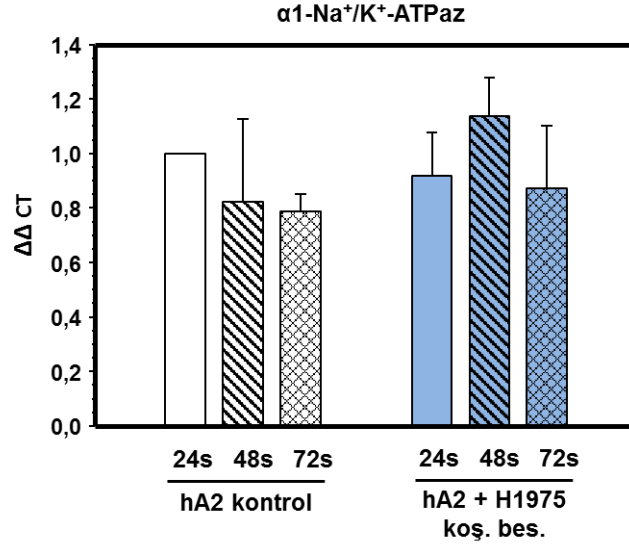
AT2 hücrelerin H1975 koş. bes. ile muamele edilmesi sonucunda  $\text{Na}^+$  transportunu ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ı arttırmaktadır. Bu etkiyi mRNA düzeyinde araştırmak için AT2 ve H1975 koş. bes. deney örneklerinden RNA izole edildi. ENaK'ın alt üniteleri olan  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  alt üniteleri ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın alt ünitesi olan  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz, RT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyi ölçüldü. AT2 ile H1975 koş. bes. ile muamele edilmesi,  $\alpha$ -ENaK ve

$\gamma$ -ENaK alt ünitesinin mRNA ekspresyonunu etkilememektedir.  $\beta$ -ENaK alt ünitesi mRNA ekspresyonunda H1975 koş. bes. örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmektedir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 4.32).  $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz'ın mRNA ekspresyonuna bakıldığında ise herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.32 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$  alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3)

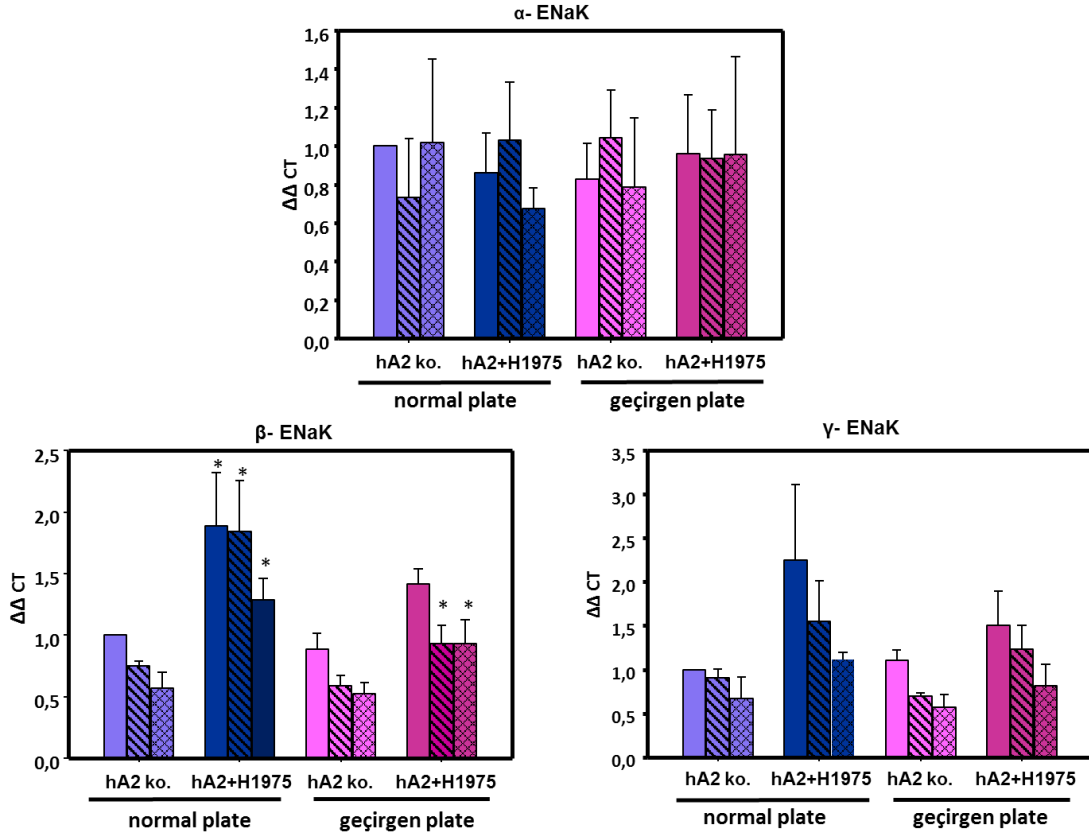


Şekil 4.33 A549 koşullandırılmış besiyeri uygulanması örneklerinin  $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3)

#### 4.2.4.2 H1975 ile AT2 yapılan ko-kültür mRNA ekspresyon bulguları

Daha önceden de belirtildiği gibi normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan H1975 ile AT2 ko-kültürü, normal plate deneylerinde Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesini artırır. Bu etkinin mRNA düzeyinde ekspresyonuna bakmak için normal ve geçirgen plate örneklerinden RNA izole edilerek epitel Na<sup>+</sup>-kanallarının (ENaK) alt üniteleri ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ) RT-PCR yöntemi ile ölçüldü. AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü, her iki plate türünde  $\alpha$ -ENaK alt ünitenin mRNA ekspresyonlarında bir değişime neden olmamaktadır.  $\beta$ -ENaK alt ünitenin mRNA ekspresyonları her iki plate türünde de artış göstermektedir ( $p < 0.05$ ).  $\gamma$ -ENaK alt ünite mRNA ekspresyonunda ise normal plate 24. saat örneklerinde artmış gibi görülsede bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.34).

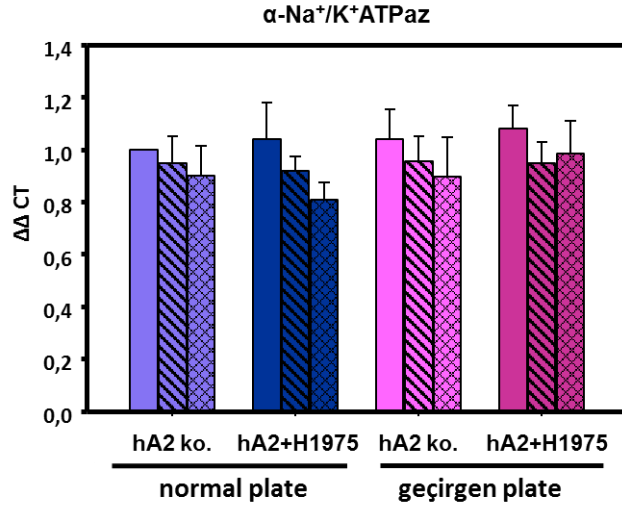


Şekil 4.34 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK ve ENaK- $\gamma$  alt ünitelerin mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.)

(\*)  $p < 0.05$  Ardışık kontrol grubuna göre anlamlı (n=3)

Normal ve geçirgen plate kullanılarak yapılan H1975 ile AT2 ko-kültürü, normal plate deneylerinde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinde artışın ardından azalma eğiliminde iken geçirgen platelerde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinde bir değişim gözlenmediği daha önceden belirtilmişti ( $p < 0.001$ ). Bu etkinin  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın mRNA ekspresyonuna bakıldığında her iki plate türünde de H1975 ile AT2 ko-kültürü bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.35).



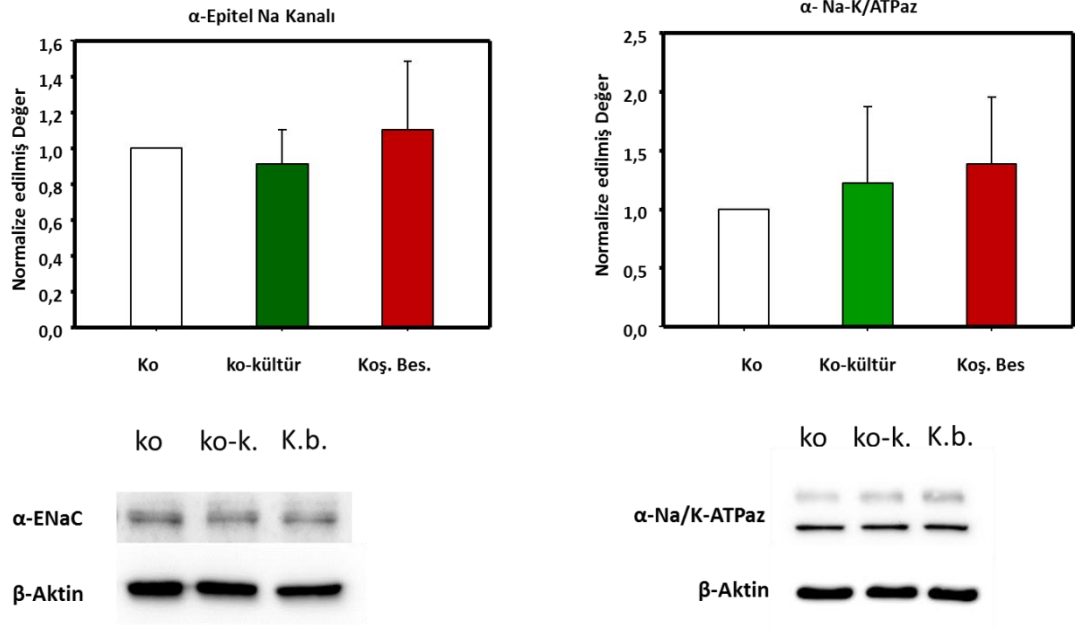
Şekil 4.35 AT2 ile H1975 hücre ko-kültürü normal ve geçirgen plate örneklerinin  $\alpha$ 1-Na/K-ATPaz mRNA ekspresyon değerleri

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3)

#### 4.2.5 H1975 ile AT2 yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin protein ekspresyon bulguları

Temel deney protokolüne bağlı kalınıp primer insan AT2 hücre izolasyonu yapıldı. H1975 koş. bes. AT2 hücreleri ile 24 saat muamele edildi. Aynı zamanda H1975 ile AT2 hücrelerin 24 saat ko-kültürü yapıldı. 24 saat sonunda AT2 hücreleri lizis edildi ve protein miktarları ölçüldü. Bu örneklerle  $\alpha$ -Epitel sodyum kanalı ( $\alpha$ -ENaK),  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz ve internal kontrol (housekeeping control) olarak  $\beta$ -Aktinin protein ekspresyonu western blot yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlara göre; AT2 ile H1975 ko-kültürü ve H1975 koş. bes.'e maruz bırakılan AT2 hücrelerinin  $\alpha$ -ENaK protein ekspresyonunu etkilememektedir. Aynı şekilde AT2 ile H1975 ko-kültürü ve H1975 koş. bes.'e maruz bırakılan AT2 hücrelerinin  $\alpha$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz protein ekspresyonunu etkilememektedir (Şekil 4.36).





Şekil 4.36 AT2 ile H1975 koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneylerinin  $\alpha$ -ENaK ve  $\alpha$ 1-Na-K/ATPaz protein ekspresyonu

(Bulgular  $\pm$ SD olarak verilmiştir.) (n=3-4)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akciğer kanseri, 20. yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en sık görülen kanser türü haline gelmiştir (Spiro ve Porter 2002). Tüm dünyada kanser olgularının %12,8'inden ve kanser ölümlerinin %17,8'inden akciğer kanseri sorumludur (Parkin vd. 1999).

Akciğer kanserli olgularda tanı sonrası 5 yıllık yaşam, 1974-76 yılları arasında % 12 iken 1992-97 yılları arasında çok az yükselmiş ve % 15 oranına ulaşmıştır (Jemal vd. 2002). Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa toplumlarında sigara karşıtı kampanyalar sonucu akciğer kanseri sıklığı 1980'den sonra erkeklerde azalma eğilimine girmiştir. Kadınlarda sigara kullanımı alışkanlığındaki artış nedeniyle Doğu Avrupa ülkeleri ve ülkemizde akciğer kanseri sıklığı giderek artmaktadır (Çelik 2001) Akciğer kanseri sadece 2001 yılında bir milyondan fazla ölüme neden olmuştur (Postmus 1998, Spiro ve Porter 2002).

Akciğer kanseri gelişiminden % 94 oranında sigara sorumludur, sigara içenlerde akciğer kanseri riski içmeyenlere oranla 24-36 kat daha fazladır. Pasif sigara içiminde risk % 3,5'tur. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi (filtreli, filtresiz, puro, düşük tar ve nikotin içeriği vb.) akciğer kanseri gelişme riskini etkiler (Halilçolar vd. 1999). Bir akciğer kanseri türü olan adenokarsinomlar %25-40 oranında görülür. Son yıllarda adenokarsinom oranı yükselmiş olup, skuamöz hücreli karsinom oranına yaklaşmıştır. Sigara içiminin tümörle ilişkisi diğer tiplere göre daha az olmakla birlikte, son yıllarda düşük katranlı sigaraların daha derin aspirasyonu ile oluşan etkinin bu tip tümörlerin artmasına yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca, adenokarsinomlar sigara içmeyen kadınlarda daha sık görülür (Subramanian ve Govindan, 2007). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda bir tanesi sigara içen hastadan izole edilen A549 adenokarsinom hücre serisi ve diğeri sigara içmeyen hastadan izole edilen H1975 adenokarsinom hücre serisi kullanıldı.

TMÇ kan damarları, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, diğer hücreler, sinyal molekülleri, ekstraselüler matris ve tümör dahil olmak üzere var olan hücrel bir ortamdır. Tümörü saran hücreler kanser stromasını oluşturur. Bu hücrelerin hiçbiri kendi başına malign hücre değildir ancak TMÇ’inde birbirleriyle ve kanser hücresiyle direkt ya da indirekt etkileşim sonucu anormal fenotip kazanırlar ve fonksiyonları değişir (Li vd. 2007). Bu bilgilerin doğrultusunda çalışmamız temel iki metod üzerine kurulmuştur. Hücre-hücre etkileşiminin incelenmesi için sağlıklı insan AT2 hücresi ile kanser hücresi ko-kültürün yapılmasıdır. Böylelikle kanser hücresinin direkt etkisi anlaşılabilir. Diğer metod ise sağlıklı insan AT2 hücresinin koşullandırılmış besiyeri ile muamele edilmesidir. Bu yöntem ile kanser hücresinin salgıladığı çözünür haldeki bütün moleküllerin ve metabolitlerin AT2 hücresini indirekt olarak nasıl etkilediği anlaşılabilir.

Adenokarsinom hücrelerinden (A549 ve H1975) elde edilen koşullandırılmış besiyerleri (koş. bes.) ve AT2 hücresi ile yapılan deneyler incelendiğinde; AT2 hücreleri adenokarsinom koş. bes. ile muamele edilmesi sonucunda, adenokarsinom koş. bes.’leri AT2 hücresinin TEER’i ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunu artırmıştır (p<0.001). Adenokarsinom koş. bes.’lerine maruziyetinin AT2 hücrelerinin proliferasyonunu etkilemediği gözlemlendi.

Na<sup>+</sup>-iyon transportunu arttırdığı bilinen çeşitli faktörler vardır. Bunlardan bazıları; glukokortikoidler, mineralokortikoidler gibi steroidler, tiroid, dopamin gibi hormonlar, β adrenerjik reseptörün stimüle edilmesi gibi uyarıcı faktörler alveolar reabsorpsiyonu arttırmaktadır (Crandall ve Matthay 2001, Matthay 2014). Adenokarsinom hücrelerin bu faktörlerden biri aracılığı ile mi yoksa bilinmeyen bir mekanizma kullanarak mı bu stimülasyonu sağladığını anlayabilmek için çeşitli deneyler yapıldı. Bunlardan birincisi; koşullandırılmış besiyeri içerisindeki çözünür faktörler, moleküler ağırlığına göre ayrıldı. Bu işlemde 10.000 moleküler ağırlığa kadar molekülleri geçiren filtreler kullanıldı. Filtrelenmiş adenokarsinom koş. bes. AT2 hücrelerinde alveolar bariyer gerginliğinde ve Na<sup>+</sup>-iyon transportunda bir değişikliğe neden olmadı.

Steroidler içerdikleri karbon atomu (C) sayısı baz alınarak sınıflandırılırlar. Örneğin; kolestrol 27 C, progesteron 21 C, testosteron 19 C ihtiva eder (Edgren ve Stanczyk 1999). Steroidlerden glukokortikoid (Tchepichev vd. 1995, Barquin vd. 1997) ve mineralokortikoidlerin (Suzuki vd. 1998, Suzuki vd. 2001) Na<sup>+</sup>-iyon transportunu stimüle ettiği birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Çalışmamızda 10.000 moleküler ağırlığından daha küçük molekülleri içeren adenokarsinom koş. bes.'leri Na<sup>+</sup>-iyon transportunu uyarmadığı görülmektedir. 10.000 moleküler ağırlıktan daha küçük moleküllere steroidlerin de dahil olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, Na<sup>+</sup>-iyon transportundaki artışa steroidlerin neden olmadığı düşünülmektedir.

İkinci olarak; hücrelerden salgılanan ve diğer hücelere ulaşarak o hücrede faaliyet gösterebilen ekzozomların aktivitesi, adenokarsinom koş. bes.'nden ekzozom izolasyonu yapılarak AT2 hücresindeki etkisi incelendi. Aynı zamanda ekzozomları uzaklaştırılmış adenokarsinom koş. bes. süpernatantı ve kıyaslama yapabilmek için önceki deneylerde kullanılan adenokarsinom koş. bes. de AT2 hücresine uygulandı. A549 koş. bes.'nde ekzozomların Na<sup>+</sup>-iyon transportuna etkisi görülmezken H1975 koş. bes.'inde artış görülmektedir. Fakat her iki adenokarsinom koş. bes. ve adenokarsinom koş. bes. süpernatantı da Na<sup>+</sup>-iyon transportunu arttırmaktadır.

Ekzozomlar; yakın ya da uzak mesafedeki hücrelerin birbirleri ile iletişimini sağlar. Genetik bilginin bu yolla transferi ile epigenetik mekanizmaları aktif hale getirmektedirler (Camussi vd. 2011). Tümör kaynaklı mikroveziküllerin, kanser teşhisinde belirteç (biomarker) olabileceği ileri sürülmektedir (D'Souza-Schorey ve Clancy 2012). Aynı zamanda gen terapi olarak da kullanılacağına dair görüşler vardır (Lee vd. 2012). Wysoczynski ve arkadaşının akciğer kanser hücre serileri kullanarak yaptığı çalışmada A549 hücre serisi de kullanılmıştır. Hipoksi ve gama-irradiasyonla uyarılması sonucu A549 hücrelerinin çeşitli mikrovezikülleri salgıladığı tespit edilmiş ve bu mikroveziküllerin TMC için önemli bir bileşen olduğunu ve tümör büyümesi, metastaz ve anjiyogenezde rol oynadığını ortaya koymuştur (Wysoczynski ve Ratajczak 2012). Yapılan çalışmalarda ekzozomların ne kadar aktif rol oynayabileceğinden söz edilmiş olsa da kendi çalışmamızda ekzozomların etkisine rastlanılmamıştır. Adenokarsinom koş. bes. süpernatantlarının Na<sup>+</sup>-iyon transportunu arttırdığı göz önüne

alındığında Na<sup>+</sup> transportunu etkileyen faktörlerin hala ekzozomlardan uzaklaştırılmış koş. bes.'nin içeriğinde olabileceği düşünülmektedir.

Akciğer kanseri HGF (Tsao vd. 2001), VEGF (Bremnes vd. 2006), MCP-1 (Cai vd. 2009), ICAM-1 (Yasuda vd. 2001) ve Angiopoitein-2 (Park vd. 2007) moleküllerini salgılamaktadır. Üçüncü olarak; kanser hücrelerinin salgıladığı bu moleküllerin adenokarsinom koş. bes.'ndeki düzeylerinin belirlenmesi için Luminex yöntemi ile ölçüm yapıldı. Adenokarsinom koş. bes.'nde HGF ve Angiopoietin-2 molekülleri tespit edilemezken VEGF, ICAM-1 ve MCP-1 molekülleri belirlendi. Fakat belirlenen moleküller yüksek standart sapmaya sahiptir ve her zaman aynı oranda salgılanmamaktadır. Bu nedenle, Na<sup>+</sup>-iyon transportunda etkin rol oynadıkları düşünülmemektedir.

Adenokarsinom hücreleri ile AT2 hücreleri sırası ile 50.000, 100.000 ve 250.000 olan üç farklı hücre yoğunluğuna göre ko-kültürü yapıldı. Ko-kültür deney sonuçlarına göre; AT2 ile adenokarsinom hücre ko-kültürü TEER ve Na<sup>+</sup>-kanal aktivitesini istatistiksel olarak 24. saatte arttırırken (p<0.001) uzun süre maruziyette azaltmaktadır. Adenokarsinom hücrelerinden A549 ile AT2 ko-kültürü Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz aktivitesini ise etkilememektedir.

Adenokarsinom ile AT2 ko-kültürü esnasında metabolik aktiviteyi tespit etmek için süpernatant örnekleri alınıp glukoz ve laktat düzeyleri ölçülmüştür. AT2 ile A549 ko-kültürün kültür besiyerindeki glukoz seviyesi azalırken laktat seviyesi artmaktadır (p<0.001).

Warburg etkisi olarak kabul edilen görüşe göre kanser hücrelerinde aerobik koşullar altında normal hücelere kıyasla 10 kat fazla glukoz tüketimi ve laktat üretimi olmaktadır (DeBerardinis vd. 2008, Koppenol vd. 2011). Metabolit yarışına giren kanser hücrelerin yoğun laktat oluşturması sonucu ortamın pH'ının azalması ile temel fonksiyonlar tehlikeye girmektedir. Hipoksi Na<sup>+</sup>-iyon transportunu inhibe etmektedir (Wodopia vd. 2000, Mairbäurl vd. 2002, Carpenter vd. 2003). Bu bilgiler

doğrultusunda yapılan ko-kültürü sonuçlarına göre; artan kanser hücre sayısı ile birlikte AT2 hücrelerinin uzun süreli maruziyet ile daha belirgin olarak görülen  $\text{Na}^+$ -transportun azalmasına hangi faktörün etkili olduğunu inceleyebilmek için hipoksik ortamı ortadan kaldıran  $\text{O}_2$  geçirgenliği sağlayan özel geçirgen plateler kullanılarak ko-kültür deneyleri tekrarlandı. Geçirgen plate ile tekrarlanan ko-kültür deneyleri için alveolar bariyer gerginliğine ve  $\text{Na}^+$ -transportunda artışa yol açan ve aynı zamanda uzun maruziyet sonucu alveolar bariyer gerginliğine ve  $\text{Na}^+$ -transportunun azalmasına neden olan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan 100.000 hücre sayısı seçildi.

Geçirgen plate kullanılarak yapılan ko-kültür deney sonuçlarına göre ise; AT2 ile adenokarsinom hücre ko-kültürü, her iki plate türünde de alveolar bariyer gerginliğini arttırmaktadır ( $p < 0.001$ ). Adenokarsinom hücre ile ko-kültür, AT2 hücrelerinin normal plate deneylerindeki  $\text{Na}^+$ -kanal aktivitesini 24. saatte arttırırken geçirgen plate deneylerinde  $\text{Na}^+$ -kanal aktivitesini etkilememektedir ( $p < 0.001$ ). A549 ile ko-kültür AT2 hücrelerinin normal ve geçirgen plate deneylerinde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinde herhangi bir değişim gözlenmemektedir. H1975 ile ko-kültür ise  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi normal plate deneylerinde 24. saat artışının ardından azalma eğiliminde iken geçirgen platelerde  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinde bir değişime neden olmaz ( $p < 0.001$ ).

Metabolik aktivitenin geçirgen platelerde farklılık gösterip göstermediğini anlayabilmek için yapılan ölçüme göre normal ve geçirgen platelerdeki glukoz tüketimi ve laktat üretimi arasında fark bulunmamaktadır. Plate türüne göre metabolik aktivitede bir fark olmadığı açıkça tespit edilmiştir. Bu bulgular, azalmış AT2 hücre fonksiyonunun  $\text{O}_2$  aracılığı ile düzeldiğini ve artan adenokarsinom hücre sayısı ile birlikte hipoksik bir ortamın oluştuğunu göstermektedir. Akciğer kanseri ve TMÇ ile yapılan çalışmalar, hipoksi ve angiogenesis üzerine yoğunlaşmıştır (Graves vd. 2010). TMÇ genelde hipoksiktir. Bu hipoksik çevre; genetik stabiliteyi, nükleotid eksizyon tamir mekanizması ve yanlış eşleşme tamir mekanizması regülasyonunu azaltarak bozmaktadır. Böylelikle kanser gelişimi hızlanmaktadır. (Blagosklonny 2004, Bindra vd. 2005). Bu çalışmalar hipoksik ortamın varlığı ile ilgili bulgularımızı destekler niteliktedir.

Yapılan koşullandırılmış besiyeri ve ko-kültür deneyleri ENaK'ın alt üniteleri olan  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  alt ünitelerin ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın alt ünitesi olan  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitesinin mRNA ve protein ekspresyonları incelendi. AT2 ile adenokarsinom koş. bes. ile muamele edilmesi,  $\alpha$ -ENaK'ın ve  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz'ın alt ünitesinin mRNA ekspresyonlarında bir değişime neden olmamaktadır. AT2 ile A549 koş. bes.'ne maruziyet  $\beta$ -ENaK alt ünitesinin mRNA ekspresyonlarını 48. ve 72. saatte ve  $\gamma$ -ENaK alt ünitesini 24., 48. ve 72. saatte azaltmaktadır ( $p < 0.05$ ). AT2 ile H1975 koş. bes. ile maruziyeti ise  $\beta$ -ENaK alt ünitesi mRNA ekspresyonunu arttırmaktadır ( $p < 0.05$ ) ancak  $\gamma$ -ENaK alt ünitesinin mRNA ekspresyonunu etkilememektedir.

AT2 ile adenokarsinom hücre ko-kültürü, her iki plate türünde  $\alpha$ -ENaK,  $\gamma$ -ENaK ve  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitenin mRNA ekspresyonlarında bir değişime neden olmamaktadır. AT2 ile adenokarsinom hücre ko-kültürü  $\beta$ -ENaK alt ünitenin mRNA ekspresyonlarını her iki plate türü ile yapılan deneylerde 24. saatte arttırmaktayken ( $p < 0.05$ ), uzun süreli uygulamada bir etki görülmemektedir.

$\alpha$ -ENaK ve  $\alpha$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz protein ekspresyonları incelendiğinde; AT2'nin A549 koş. bes.'ne maruziyet  $\alpha$ -ENaK protein düzeyini arttırmaktadır ( $p < 0.05$ ) ve A549 ile ko-kültür ise  $\text{Na}/\text{K}$ -ATPaz protein düzeyini azaltmaktadır. H1975 koş. bes. ve ko-kültür deneyi  $\alpha$ -ENaK ve  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz protein düzeylerini etkilememektedir.

Sıçanlarla *in vivo* yapılan bir çalışmada, hipoksi tarafından  $\text{Na}^+$  transportu inhibe edilmiştir. Ancak bu durum  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK,  $\gamma$ -ENaK ve  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitelerinin mRNA ekspresyonunu etkilememiştir (Carpenter vd. 2003). Hipoksiye maruz bırakılan sıçan AT2 hücrelerinin apikal membranına biyotinlasyon uygulanmıştır. Western blot ile protein ekspresyonuna bakıldığında hipoksi inhibisyonu nedeniyle meydana gelen  $\text{Na}^+$  kanallarındaki fonksiyonel azalmanın apikal membrandaki  $\beta$ -ENaK ve  $\gamma$ -ENaK alt ünitelerindeki azalma ile paralel olduğu ortaya konmuştur (Planes vd. 2002). Diğer bir çalışmada ise hipoksi maruziyetinin ardından sıçandan izole edilen AT2 hücrelerinde  $\alpha$ -ENaK ve  $\beta 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitelerin mRNA ekspresyonu arttarken  $\gamma$ -ENaK ve  $\alpha 1$ - $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitelerin mRNA seviyelerinde bir

değişiklik gözlenmemiştir. Yine aynı çalışmada AT2 hücrelerinin  $\alpha$ -ENaK protein ekspresyonu artmıştır. Fakat  $\alpha$ 1- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz ve  $\beta$ 1- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz protein ekspresyonlarında değişiklik gözlenmemiştir (Vivona vd. 2001). Hipoksinin indüklediği A549 hücrelerinde  $\alpha$ -ENaK,  $\beta$ -ENaK,  $\gamma$ -ENaK protein ekspresyonunun azaldığı ve sıçan akciğer örneğinde ise  $\alpha$ 1- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz protein ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Wodopia vd. 2000). Hipoksiye maruz kalan A549 hücrelerinde  $\beta$ -ENaK mRNA ekspresyon oranı  $\alpha$ -ENaK ve  $\gamma$ -ENaK'ın mRNA ekspresyon oranına kıyasla 5 kat daha fazladır (Güney vd. 2007). Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda ENaK ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz alt ünitelerinin hipoksiye olan cevapları farklıdır. Açıkça görülmektedir ki azalmış  $\text{Na}^+$  iyon transportu aynı oranda değişen mRNA ve protein ekspresyonu ile açıklanamamaktadır. Çalışmamızda ko-kültür deneyleri 24. saatteki  $\beta$ -ENaK mRNA ekspresyonundaki artışın hipoksi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Adenokarsinom koş. bes.'leri AT2 hücrelerinin TEER'i ve  $\text{Na}^+$ -iyon transportunu arttırmıştır.
- Adenokarsinom koş. bes. AT2 hücrelerinin proliferasyonunu etkilememektedir.
- Adenokarsinom koş. bes. AT2 hücrelerinin  $\text{Na}^+$ -iyon transportunu steroid, ekzozomlar aracılığı ile stimüle etmemektedir.
- Adenokarsinom hücre ile AT2 ko-kültürü  $\text{Na}^+$  transportunu ve  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktivasyonunu 24. saatte stimüle etmektedir ve uzun süre maruziyet sonucu azaltmaktadır. Geçirgen plate ile tekrarlanan ko-kültür, bu azalmayı önlemektedir.
- Adenokarsinom hücreleri plate türü fark etmeksizin aynı oranda glukoz tüketmekte ve laktat oluşturmaktadır.
- A549 koş. bes.  $\beta$ -ENaK ve  $\gamma$ -ENaK mRNA ekspresyonunu azaltırken H1975 koş. bes.  $\beta$ -ENaK mRNA ekspresyonu arttırmaktadır. Adenokarsinom hücre ile ko-kültür,  $\beta$ -ENaK mRNA ekspresyonunu 24. saatte arttırmaktadır ve uzun



maruziyet sonucu azaltmaktadır ve  $\alpha$ -ENaK,  $\gamma$ -ENaK ve  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz mRNA ekspresyonları ise etkilenmemektedir.

- AT2'nin A549 koş. bes.'ne maruziyet  $\alpha$ -ENaK protein düzeyini arttırmaktır ve A549 ile ko-kültür ise Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz protein düzeyini azaltmaktadır. H1975 koş. bes. ve ko-kültür deneyi  $\alpha$ -ENaC ve  $\alpha 1$ -Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz protein düzeylerini etkilememektedir.

AT2 hücrelerinin adenokarsinom hücrelerinin mRNA ve protein ekspresyonlarına verdiği yanıtın farklı olduğu gözlenmektedir. Adenokarsinom hücreleri aynı hücre tipi olmasına rağmen farklı hastalardan izole edilmiş olmaları, o hastaların sigara kullanımı, genetik farklılıkları, yaşam standartı ve çevresel faktörleri gibi sayılabilecek birçok etkenden dolayı bu hücrelerde bireysel farklılıklar ortaya çıkabilmektedir.

Bu sonuçlar göstermektedir ki; adenokarsinom hücreleri AT2 hücrelerinin alveolar epitel fonksiyonlarını çözünür faktörler aracılığı ile stimüle edebilmektedir. Yaptığımız bir dizi deneme sonucu bu faktörlerin steroid, ekzozomlar ve bir takım moleküller olmadığı tespit edilmiştir. Adenokarsinom hücreleri ile ko-kültür Na<sup>+</sup>-iyon transportunu uzun maruziyet sonucunda oluşan hipoksi nedeniyle azaltmaktadır. Bu durumun sebebi kanser hücrelerin yüksek O<sub>2</sub> tüketimi sonucu olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamız sağlıklı insan AT2 hücrelerinin adenokarsinom hücreleri karşısında Na<sup>+</sup>-iyon transportunun cevabını ortaya koyan ilk çalışmadır. Na<sup>+</sup>-iyon transportunu etkileyen faktörlerin iyice anlaşılabilmesi için ileri hücresel mekanizmaları değerlendirmek gereklidir. Çalışmamız bu anlamda temel bulguları ortaya koyan bir ön çalışma niteliğindedir.

## KAYNAKLAR

- Adkolfer, F. 2001. Lung cancer due to passive smoking-a review. *Int Arch Occup Environ Health*, 74(4):231-41.
- Albert, A.J and Samet, J.M. 2003. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123:21-49.
- Anonymus, 1992. US Environmental Protection Agency (EPA): Respiratory health effect of passive smoking: Lung cancer and other disorders. Epa Publication. Washington, DC:US, Government Printing Office.
- Anonymus, 2009. World Health Organization. Who handbook on indoor radon. Geneva, Switzerland. WHO Press, Page: 4-17.
- Anonymus, 2015a. Web sitesi: <http://www.abc.net.au/health/library/stories/2010/07/29/2967396.htm> Erişim Tarihi: 18.10.2015.
- Anonymus, 2015b. Web sitesi: <http://www.shutterstock.com/s/alveolus/search.html> Erişim tarihi: 23.08.2015.
- Anonymus, 2015c. Web sitesi: <http://melss.med.mun.ca/EMR/090048%20%20Lung%20type%20II%20alveolar%20ccell.jpg>. Erişim tarihi: 24.08.2015.
- Anonymus, 2015d. Web sitesi: <http://www.zuniv.net/physiology/book/chapter1.html>. Erişim tarihi: 26.08.2015.
- Anonymus, 2015e. Web sitesi <http://www.atcc.org>. Erişim Tarihi: 13.10.2015.
- Aygenel, Ş.G., Oğuzülgen, İ.K. ve Öztürk, C. 2005. Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde Uzun Dönem Sağkalımda Prediktif ve Prognostik Faktörlerin Gözden Geçirilmesi. *Türk Toraks Dergisi*. Cilt 6, Sayı 1, Say. 081-084.
- Barker, P.M., Nguyen, M.S., Gatzky, J.T., Grubb, B., Norman, H., Hummler, E., Rossier, B., Boucher, R.C. and Koller B. 1998. Role of  $\gamma$ -ENaC subunit in lung liquid clearance and electrolyte balance in newborn mice. Insights into perinatal adaptation and pseudohypoaldosteronism. *J Clin Invest*, 102: 1634–1640.
- Barquin, N., Ciccolella, D.E., Ridge, K.M. and Sznajder, J.I. 1997. Dexamethasone upregulates the Na-K-ATPase in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 273: L825–L830.
- Beasley, M.B., Brambilla, E. and Travis, W.D. 2005. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*, Apr;40(2):90-7.

- Berthiaume, Y., Staub, N.C. and Matthay, M.A. 1989. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest*, Feb; 79(2): 335–343.
- Bertorello, A.M. and Katz, A.I. 1993. Short-term regulation of renal Na-KATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 265: F743–F755.
- Bindra, R.S. and Glazer, P.M. 2005. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 569, Issues 1–Pages 75–85.
- Bissell, M.J. and Radisky, D. 2001. Putting tumours in context, *Nat. Rev. Cancer*, 1: 46–54.
- Blagosklonny, M.V. 2004. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell*, Volume 5, Issue 1, Pages 13–17.
- Blanco, G., Sanchez, G. and Mercer, R.W. 1998. Differential regulation of Na/K-ATPase isoforms by protein kinases and arachidonic acid. *Arch Biochem Biophys*, 359:139–150.
- Borok, Z., Hami, A., Danto, S.I., Lubman, R.L., Kim, K.J. and Crandall, E.D. 1996. Effects of EGF on alveolar epithelial junctional permeability and active sodium transport. *Am J Physiol*, 270:L559–L565.
- Bouchardy, D., Benhamou, S., Jourenkova, N., Dayer, P. and Hirvonen, A. 2001. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32: 109-112.
- Bremnes, R.M., Camps, C. and Sirera, R. 2006. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer*, Feb;51(2):143-58.
- Bryant, A. and Cerfolio, R.J. 2007. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest*. Jul, 132(1):185-92.
- Bulay, O. 1995. Akciğer kanserleri patolojisi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 15(6):365-73.
- Burnette, W.N. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112 (2): 195–203.

- Burri, P.H., Gil, J. and Weibel, E.R. 2005. General Thoracic Surgery. In: Ultrastructure and Morphometry of the Human Lung. Editors: Shields T.W., LoCicero J., Ponn R.B. and Rusch, V.W. 6. Edition. 33-35 p. Lippincott Williams & Wilkin Press. Philadelphia ABD.
- Cai, Z., Chen, Q., Chen, J., Lu, Y., Xiao, G., Wu, Z., Zhou, Q. and Zhang, J. 2009. Monocyte chemotactic protein 1 promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in vivo. *Neoplasia*, Mar;11(3):228-36.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Grange, C., Fonsato, V. and Tetta, C. 2011. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res.* 1(1):98-110.
- Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J.D. and Rossier, B.C. 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature*, 367: 463–46.
- Carpenter, T.C. Schomberg, S., Nichols, C., Stenmark, K.R. and Weil, J.V. 2003. Hypoxia reversibly inhibits epithelial sodium transport but does not inhibit lung ENaC or Na-K-ATPase expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Jan;284(1):L77-83.
- Cheek J.M., Kim K.J. and Crandall E.D. 1989. Tight monolayers of rat alveolar epithelial cells: bioelectric properties and active sodium transport. *Am J Physiol Cell Physiol*, 256:C688–C693.
- Chen, X.J., Eaton, D.C. and Jain, L. 2002. Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Apr;282(4):L609-20.
- Clarke, L.L. 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296(6): G1151–G1166.
- Crandall, E.D. and Matthay, M.A. 2001. Alveolar Epithelial Transport. *Basic. Science to Clinical Medicine. Am J Respir Crit Care Med*, Vol 162. pp 1021–1029.
- Çelik, İ. 2001. Akciğer kanserinde epidemiyoloji. In: Engin K, Özyardımcı N; eds. Akciğer kanserleri. Tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. p. 50-56.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G. and Thompson, C.B. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*, Jan;7(1):11-20.
- Dobbs L.G., Gonzalez R., Matthay M.A., Carter E.P., Allen L. and Verkman A.S. 1998. Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 17;95(6):2991-6.

- D'Souza-Schorey, C. and Clancy, J.W. 2012. Tumour-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev.* 26:1287-1299.
- Duam, N., Kuehn, A., Hein, S., Schaefer, U.F., Huwer, H. and Lehr, C.M. 2012. Isolation, cultivation and application of human alveolar epithelial cells. *Methods Mol Biol*, 806:31-42.
- Duhamel, R.C., Meezan, E. and Brendel, K. 1981. The addition of SDS to the Bradford dye-binding protein assay, a modification with increased sensitivity to collagen. *J Biochem Biophys Methods*, Aug;5(2):67-74.
- Eaton, D.C., Chen, J., Ramosevac, S., Matalon, S. and Jain, L. 2004. Regulation of Na<sup>+</sup> channels in lung alveolar type II epithelial cells. *Proc Am Thorac Soc*, 1(1):10-6.
- Edgren, R.A and Stanczyk, F.Z. 1999. Nomenclature of the gonane progestins. *Contraception*. Dec;60(6):313.
- Ehrhardt, C., Kim, K.J. and Lehr, C.M. 2005. Isolation and culture of human epithelial cells. *Human cell culture protocols*, 2. edition. Humana press, Volume 107, 207-216. Totowa, USA
- Factor, P., Saldias, F., Ridge, K., Dumasius, V., Zabner, J., Jaffe, H.A., Blanco, G., Barnard, M., Merce, r R., Perrin, R., and Sznajder, J.I. 1998. Augmentation of lung liquid clearance via adenovirus-mediated transfer of a Na,K-ATPase  $\beta$ 1 subunit gene. *J Clin Invest*, 102: 1421–1430.
- Folkesson, H.G., Norlin, A., Wang, Y., Abedinpour, P. and Matthay, M.A. 2000. Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats. *Am J Physiol*, 88:416–424.
- Fong, K.M., Sekido, Y., Gazdar, A.F. and Minna, J.D. 2003. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax*, 58: 892–900.
- Fong, K.W., Sekido, Y. and Minna, J.D. 1999. Molecular pathogenesis of lung cancer. *J. Thorac Cardiovasc. Surg*, 118: 1136-1152.
- Garty, H. 1994. Molecular properties of epithelial, amiloride-blockable Na<sup>+</sup> channels. *FASEB J*, 8:522–528.
- Geradts, J., Fong, K.M., Zimmerman, P.V., Maynard, R. and Minna, J.D. 1999. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*, 5(4):791-800.
- Gil, J., Silage, D.A. and McNiff, J.M. 1981. Distribution of vesicle in cells of air-blood in the rabbit. *J Appl Physiol*, 50:334-340.

- Gomperts, B.N., Spira, A., Massion, P.P., Walser, T.C., Wistuba, I.I., Minna, J.D. and Dubinett, SM. 2011. Evolving concepts in lung carcinogenesis. *Semin Respir Crit Care Med*, 32(1):32-43. Graves E.E., Maity A. and Le Q.T. 2010. The tumor microenvironment in non-small lung cancer. *Semin Radiat Oncol*, 20(3): 156-163
- Goodman, B.E. 1993. Lung fluid clearance. In: *Fluid and Solute Transport in the Air Spaces of the Lungs*, edited by Effros RM and Chang HK. New York: Dekker, , p. 139–183.
- Goodman, B.E. and Crandall, E.D. 1982. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 243:C96-C100.
- Guney, S., Schuler, A., Ott, A., Hoschele, S., Zugel, S., Baloglu, E., Bärtsch, P and Mairbäurl, H. 2007. Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 293: L1332–L1338.
- Halilçolar, H., Tatar, D., Ertuğrul, G., Çakan, A., Acıtaş, M.G. ve Kömürcüoğlu, B. 1999. Epidemiyoloji. In: Akkoçlu A, Öztürk C; eds. *Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım*. Toraks Kitapları, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. p 17-22.
- Hecht, S.S. 2002. Cigarette smoking and lung cancer: Chemical mechanism and approaches to prevention. *Lancet Oncol*, 3:461-9.
- Herbst, R.S, Heymach, J.V. and Lippman, S.M. 2008. Lung cancer. *N Engl J Med*, 25;359(13):1367-80.
- Herzog, E.L, Brody, A.R., Colby, T.V., Mason, R. and Williams ,M.C. 2008. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac*, Vol 5. Pp 778-782.
- Hollenhorst, M.I., Richter, K. and Fronius, M. 2011. Ion transport by pulmonary epithelia. *J Biomed Biotechnol*, 2011:174306.
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R. and Rossier, B.C. 1996. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in  $\alpha$ -ENaC-deficient mice. *Nat Genet*, 12: 325–328.
- Inglis, P.W. and Valadares-Inglis, M.C. 1997. Rapid isolation of double-stranded RNAs from entomopathogenic species of the fungus *Paecilomyces* using a commercial minicolumn system. *J Virol Methods*, Aug;67(1):113-6.
- İtil, O. 2000. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etiolojisi. In: Haydaroğlu A. *Akciğer kanserleri; tanı ve tedavi*. 1. baskı. İzmir, Ege Üniversitesi Basımevi, 15-34.

- Jain, L., Chen, X.J., Malik, B., Al-Khalili, O.K. and Eaton, D.C. 1999. Antisense oligonucleotides against the alpha-subunit of ENaC decrease lung epithelial cation-channel activity. *AM J Physiol*, 246:L1046-1051.
- Jain, L., Chen, X.J., Ramosevac, S., Brown, L.A. and Eaton, D.C. 2001. Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *SMJ Physiol*, 280:L646-L658.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T. and Thun, M. 2002. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 52: 23-47.
- Jiang, X., Ingbar, D.H. and O'Grady, S.M. 1998. Adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup> transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl channels. *Am J Physiol*, 275:C1610–C1620.
- Johnson, M.D., Widdicombe, J.H., Allen, L., Barbry, P. and Dobbs, L.G. 2002. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):1966-71
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O. 1998. *Temel Histoloji*. (Çeviri: Aytakin Y., Solakoğlu S. Ahışhalı B.) 9. Baskı. Barış Kitabevi. 335-341. İstanbul.
- Kadara, H. and Wistuba, I.I. 2012. Field cancerization in non-small cell lung cancer: Implications in Disease Pathogenesis. *Proc. Am. Thorac. Soc*, Vol 19, Iss. 2, pp 38-42.
- Kadara, H., Kabbout, M. and Wistuba, I.I. 2012. Pulmonary adenocarcinoma: Arenewed entity in 2011. *Respirology*, 17, 50-65.
- Keyes, K.A., Mann, L., Cox, K., Treadway, P., Iversen, P., Chen, Y.F. and Teicher, B.A. 2003. Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex Multiplex technology. *Cancer Chemother Pharmacol*, Apr;51(4):321-7.
- Koontongkaew, S. 2013. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J. Cancer*, 4(1):66-83.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L. and Dang, C.V. 2011. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, May;11(5):325-37.
- Kotewicz, M.L., D'Alessio, J.M., Driftmier, K.M., Blodgett, K.P. and Gerard, G.F. 1985. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene*, 35(3):249-58.
- Köktürk, N., Kırışoğlu, C.E ve Öztürk, C. 2003. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum*, 5: 127-138.

- Kranenburg, O. 2005. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim. Biophys. Acta*, 1756: 81–82.
- Kumar, V., Abbas, A.K. and Aster, J.C. 2013. *Robbins Basic Pathology*. 9th edition. Elsevier Saunders. Philadelphia USA page. 505.
- Lasnier, J.M., Wangenstein, O.D., Schmitz, L.S., Gross, C.R. and Ingbar, D.H. 1996. Terbutaline stimulates alveolar fluid resorption in hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol*, 81:1723–1729.
- Lazrak, A., Samanta, A. and Matalon, S. 2000a. Biophysical properties and molecular characterization of amiloride-sensitive sodium channels in A549 cells. *Am J Physiol*, 278:L848–L857.
- Lazrak, A., Samanta, A., Venetsanou, K., Barbry, P. and Matalon, S. 2000b. Modification of biophysical properties of lung epithelial Na<sup>+</sup> channels by dexamethasone. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279: C762–C770.
- Lee, Y., El Andaloussi, S. and Wood, M.J. 2012. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet.* 15;21(R1):R125-34.
- Li, H., Fan, X., Houghton, J.M. 2007. Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. *J Cell Biochem*, 101: 805–815.
- Lynch, T.J. Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J. and Haber, D.A. 2004. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N. Eng. J. Med*, 350: 2129-2139.
- Mairbäurl, H., Mayer, K., Kim, K.J., Borok, Z., Bärtsch, P. and Crandall, E.D. 2002. Hypoxia decreases active Na transport across primary rat alveolar epithelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 282 no. 4.
- Mairbäurl, H., Wodopia, R., Eckes, S., Schulz, S. and Bärtsch, P. 1997. Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 273, No. 4.
- Maitra, A. and Kumar, V. 2007. *Robbins Basic Pathology* (8th ed.). Saunders Elsevier. pp. 528–529 ABD.
- Mason, R.J. and Williams, M.C. 1991. *The lung: Scientific foundations*. Crystal R.G. and West J.B (Eds). Raven Press, 235-243, New York.
- Mason, R.J., Williams, M.C., Widdicombe, J.H., Sanders, M.J. Misfeldt, D.S. and Berry, L.C.J. 1982. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc. Natl Acad Sci*, 79: 6033-6037.



- Matsushita, K., McCray, P.B., Sigmund, T.D., Welsh, M.J. and Stokes, J.B. 1996. Localization of epithelial sodium channel subunit mRNAs in adult rat lung by in situ hybridization. *Am J Physiol*, 271:L332–L339.
- Matthay, M.A. 2014. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress. *Am J Respir Crit Care Med*, Jun 1;189(11):1301-8.
- Matthay, M.A., Folkesson, H.G. and Clerici, C. 2002. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol rev*, 82: 569-600.
- McDonald F.J., Yang B., Hrstka R.F., Drummond H.A., Tarr D.E., McCray P.B., Stokes J.B., Welsh M.J. and Williamson R.A. 1999. Disruption of the  $\beta$ -subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in mice: hyperkalemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 1727–1731.
- McDonald, F.J., Snyder, P.M., McCray, P.B. and Welsh, M.J. 1994. Cloning, expression and tissue distribution of a human amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol*, 266:L728–L734.
- McDonough A.A., Geering K. and Farley R.A. 1990. The sodium pump needs its  $\beta$  subunit. *FASEB, J* 4: 1598–1605.
- McNicholas C.M. and Canessa C.M. 1997. Diversity of channels generated by different combinations of epithelial sodium channel subunits. *J Gen Physiol*, 109: 681–692.
- Motadi, L.R., Misso, N.L., Dlamini, Z. and Bhoola, K.D. 2007. Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura: Therapeutic targets. *International Immunopharmacology*, 14: 1934–1947.
- Müsellim, B. 2007. Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. *İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:58 S. 113-118.*
- Oliver, K.G., Kettman, J.R. and Fulton, R.J. 1998. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin Chem, Sep;44(9):2057-60.*
- Ovalle, W.K. and Nahirney, P.C. 2009. Netter temel histoloji (Çeviri: Müftüoğlu S. Kaymaz F. ve Atilla P.). Güneş Kitabevi, 349-350, Ankara.
- Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E. and Meyerson, M. 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 4;304(5676):1497-500.

- Park, J.H., Park, K.J., Kim, Y.S., Sheen, S.S., Lee, K.S., Lee, H.N., Oh, Y.J. and Hwang, S.C. 2007. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. *Chest*, Jul;132(1):200-6.
- Parkin, G.M., Pisani, P. and Ferlay, J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 49: 33-64.
- Planes, C., Blot-Chabaud, M., Matthay, M.A., Couette, S., Uchida, T. and Clerici, C. 2002. Hypoxia and beta 2-agonists regulate cell surface expression of the epithelial sodium channel in native alveolar epithelial cells. *J Biol Chem*, Dec 6;277(49):47318-24.
- Postmus, P.E. 1998. Epidemiology of lung cancer. In: Fishman A.P., Elias J.A., Fishman J.A. Grippi M.A. Kaiser L.R. and Senior R.M. eds: *Fishman's pulmonary diseases and disorders*. New York: McGraw Hill Companies, p. 1707-19.
- Prives, C. 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, 95: 1437-1443.
- Ridge, K.M., Rutschman, D.H., Factor, P., Katz, A.I., Bertorello, A.M. and Sznajder, J.L. 1997. Differential expression of Na-K-ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol*, Jul;273(1 Pt 1):L246-55.
- Riely, G.J., Kris, M.G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D.A., Nafa, K., Riedel, E.R., Hsu, M., Pao, W., Miller, V.A. and Ladanyi, M. 2008. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 15;14(18):5731-4.
- Roggli, V.L., Vollmer, R.T., Greenberg, S.D., McGavran, M.H., Spjut, H.J and Yesner, R. 1985. Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum. Pathol*, 16 (6): 569-79.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-91.
- Schneeberger, E.E. 1991. *The lung: Scientific foundations*. Crystal R.G. and West J.B (Eds). Raven Press, 229-233, New York.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. and Maizel, J.V.J. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.. *Biochem Biophys Res Commun*, 28 (5): 815-820.
- Siegffried, J.M. 1989. Culture of primary lung tumors using medium conditioned by a lung carcinoma cell line. *J Cell Biochem*, Oct;41(2):91-5.

- Simonato, L., Agudo, A. and Ahrens, W. 2001. Lung cancer and cigarette smoking in Europe: an update of risk estimates and an assessment of inter-country heterogeneity. *Int J. Cancer*, 91:876-87.
- Skou, J.C. 1998. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. *Biosci Rep*, 18: 155–169.
- Skuladottir, H. and Olsen, J.H. 2001. Epidemiology of lung cancer. *Eur Respir Mon*, 17, 1–12.
- Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A. and Settleman, J. 2004. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*, 20;305(5687):1163-7.
- Spiro, S.G. and Porter, J.C. 2002. Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, 166:1166-96.
- Steiling, K., Ryan, J., Brody, J.S. and Spira, A. 2008. The field of tissue in the lung and airway. *Cancer Prev Res (Phila)*, 1(6):396-403.
- Subramanian, J. and Govindan, R. 2007. Lung cancer in never smokers: a review. *Journal of Clinical Oncology (American Society of Clinical Oncology)*, 25, (5): 561–570.
- Sun, Y., Zhang, J.N., Zhao, D., Wang, Q.S., Gu, Y.C., Ma, H.P. and Zhang, Z.R. 2011. Role of the epithelial sodium channel in salt-sensitive hypertension. *Acta Pharmacol Sin*, Jun;32(6):789-97.
- Suzuki, S., Tsubochi, H., Suzuki, T., Darnel, A.D., Krozowski, Z.S., Sasano, H. and Kondo, T. 2001. Modulation of transalveolar fluid absorption by endogenous aldosterone in adult rats. *Exp Lung Res* 27: 143–155.
- Suzuki, T., Sasano, H., Suzuki, S., Hirasawa, G., Takeyama, J., Muramatsu, Y., Date, F., Nagura, H. and Krozowski, Z.S. 1998. Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human lung: possible regulator of mineralocorticoid action. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 4022–4025.
- Talcott, J.A., Thurber, W.A., Kantor, A.F., Gaensler, E.A., Danahy, J.F., Antman, K.H. and Li F.P. 1989. Asbestos-associated diseases in a cohort of cigarette-filter workers. *N Engl J Med*, 321:1220-3.
- Tchepichev, S., Ueda, J., Canessa, C., Rossier, B.C. and O’Brodivich, H. 1995. Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 269: C805–C812.
- Thery, C., Clayton, A., Amigorena, S. and Raposo, G. 2006. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids, In: *Current Protocols in Cell Biology*. p.3.22.1-3.22.29. John Wiley & Sons USA.

- Thome, U., Chen, L., Factor, P., Dumasius, V., Freeman, B., Sznajder, J.I. and Matalon, S. 2001. Na,K-ATPase gene transfer mitigates an oxidant-induced decrease of active sodium transport in rat fetal A549 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24: 245–252.
- Tonon, G., Wong, K.K., Maulik, G., Brennan, C., Feng, B., Zhang, Y., Khatri, D.B., Protopopov, A., You, M.J., Aguirre, A.J., Martin, E.S., Yang, Z., Ji, H., Chin, L. and Depinho, R.A. 2005. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 102:9625-30.
- Travis, W.D. 2011. Pathology of Lung Cancer. *Clin. Chest Med*, 32: 669–692.
- Tsao, M.S., Yang, Y., Marcus, A., Liu, N. and Mou, L. 2001. Hepatocyte growth factor is predominantly expressed by the carcinoma cells in non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol*, Jan;32(1):57-65.
- Tsilibary, P.T. and Williams, M.C. 1983. Actin in peripheral lung: S1 labelling and structural changes induced by cytochalasin. *J Histochem Cytochem*, 1289-1297.
- Vega-Avila, E. and Pugsley, M.K. 2011. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc*, 54: 10-14.
- Vivona, M.L, Matthay, M., Chabaud, M.B., Friedlander, G. and Clerici, C. 2001. Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment. *Am J Respir Cell Mol Biol*, Nov;25(5):554-61.
- Walter, F.B. and Boulpaep, E.L. 2004. *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*. 2. Edition. 605 p. Elsevier/Saunders Philadelphia USA
- Wang, Y., Folkesson, H.G., Jayr, C., Ware, L.B. and Matthay, M.A. 1999. Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy. *J Appl Physiol*, 87:1852–1860.
- Wang, S., Singh, R.D., Godin, L., Pagano, R.E. and Hubmayr, R.D. 2011. Endocytic response of type I alveolar epithelial cells to hypertonic stress. *American Journal of Physiology*, vol. 300, no. 4, pp. L560–L568.
- Weibel, E.R. 2009. What makes a good lung? *Swiss Medical Weekly*, vol. 139, no. 27-28, pp. 375–386.
- Weinberger, S.E, Cockrill B.A. and Mandel J. 2008. *Principles of pulmonary medicine*. 5. Edition. 1-3 p. Saunder Elsevier Philadelphia USA.
- Witz, I.P. and Levy-Nissenbaum O. 2006. The tumor microenvironment in post-PAGET era. *Cancer Letters*, 242, 1-10.
- Wodopia, R., Ko, H.S., Billian, J., Wiesner, R., Bärtsch, P. and Mairbörl, H. 2000. Hypoxia decreases proteins involved in epithelial electrolyte transport in A549 cells and rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Dec;279(6):L1110-9.

- Wysoczynski, M. and Ratajczak, M.Z 2009. Lung cancer secreted microvesicles: Underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. Volume 125, Issue 7, pages 1595–1603.
- Yasuda, M., Tanaka, Y., Tamura, M., Fujii, K., Sugaya, M., So, T., Takenoyama, M. and Yasumoto, K. 2001. Stimulation of beta1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. *Cancer Res*, Mar 1;61(5):2022-30.
- Yeung, Y.G. and Stanley, E.R. 2009. A solution for stripping antibodies from PVDF immunoblots for multiple reprobing. *Anal Biochem*, 1; 389(1): 89–91.
- Yoshizawa, A., Motoi, N., Riely, G.J., Sima, C.S., Gerald, W.L., Kris, M.G., Park, B.J., Rusch, V.W., Travis, W.D. 2011. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*, 24:653-664.
- Zhou, G., Dada, L.A. and Sznajder, J.I. 2008 Regulation of alveolar epithelial function by hypoxia. *Eur Respir J*, May;31(5):1107-13.
- Zuegel, S., Bartsch, P. and Mairbaurl, H. 2008. Co-culture of alveolar epithelial and endothelial cells blunts failure of alveolar barrier function in hypoxia. *The FASEB Journal*, 22:932.8-932.

# EK Etik Kurul Belgesi



Medizinische Fakultät Heidelberg

Ethikkommission der Med. Fak. HD | Alte Glockengießerel 11/1 | D-69115 Heidelberg

Herr Prof. Dr. phil. Heimo Mairbäurl  
Medizinische Klinik VII, Sportmedizin  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 410  
69120 Heidelberg

Herr Prof. Dr. med. Philipp Schnabel  
Institut für Pathologie  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 220  
69120 Heidelberg

12.05.2011  
ts-ks

## ZUSTIMMENDE BEWERTUNG (nach inhaltlicher Nachreichung)

**Unser Zeichen:** S-117/2011 (Bitte stets angeben)  
**Titel:** Signaltransduktion in humanen Alveolarepithelzellen in Hypoxie  
**Eingereichte Unterlagen:** Ersteinreichung vom 15.03.2011:  
Anschreiben vom 15.03.2011  
Zusammenfassung Version 1 vom 15.03.2011  
Formular für Erstantrag vom 15.03.2011  
Patientenaufklärung und -einwilligung bei Gewebeentnahmen Version 1 vom 15.03.2011  
Studienprotokoll Version 1 vom 15.03.2011  
CV Prof. Dr. phil. Heimo Mairbäurl vom 15.03.2011  
CV Prof. Dr. med. Phillip A. Schnabel vom 14.03.2011  
CD-ROM  
Inhaltliche Nachreichung vom 21.04.2011:  
Anschreiben vom 19.04.2011  
Formular für Erstantrag vom 20.04.2011  
Studienprotokoll Version 2 vom 19.04.2011  
CV Prof. Dr. med. Philipp A. Schnabel  
CV Prof. Dr. phil. Heimo Mairbäurl  
Patientenaufklärung bei Gewebeentnahmen Version 2 vom 19.04.2011  
Einwilligung zur Verwendung von entnommenem Gewebe für wissenschaftliche Untersuchungen zu Lungenödemen Version 2 vom 14.04.2011  
CD-ROM



Alte Glockengießerel 11/1  
D-69115 Heidelberg

☎ +49 (0) 6221 / 33 8 22 0 (Empfang)  
☎ +49 (0) 6221 / 33 8 22 22  
✉: ethikkommission-l@med.uni-heidelberg.de

www.medizinische-fakultaet-hd.uni-heidelberg.de/  
ethikkommission

**Vorsitz:**  
Prof. Dr. med. Thomas Strowitzki

**Stellv. Vorsitz:**  
Prof. Dr. med. Johannes Schröder  
Prof. Dr. med. Klaus Herfarth

**Geschäftsleitung:**  
Dr. med. Verena Pfeilschifter

**Sonstige Studien:**  
Katharina Schäfer, Betriebswirtin  
☎ +49 (0) 6221 / 33 8 22 11  
☎ +49 (0) 6221 / 33 8 22 22  
✉: Katharina.Schaefer@med.uni-heidelberg.de



**Bankverbindung:**  
Baden-Württembergische Bank Stuttgart  
Konto-Nr.: 7421 500 429  
BLZ: 600 501 01  
SWIFT/BIC Code: SOLADEST  
IBAN-Nr.: DE 64600501017421500429

© Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg 2011

Sehr geehrter Herr Professor Mairbäurl,  
sehr geehrter Herr Professor Schnabel,

mit den Änderungen bzw. Ergänzungen in den oben näher bezeichneten Dokumenten wurden die in der inhaltlichen Nachforderung vom 11.04.2011 genannten Empfehlungen der Ethikkommission berücksichtigt.

Die Ethikkommission erteilt eine **zustimmende Bewertung**.

Wir wünschen Ihnen bei der Durchführung des Projektes viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. Thomas Strowitzki  
Vorsitzender

**Allgemeine Hinweise:**

- Änderungen in Organisation und Ablauf der Studie sind der Kommission, zusammen mit einer Bewertung der Nutzen-Risiko-Relation, umgehend mitzuteilen. Sowohl die **Antragsnummer** als auch die **geänderten Passagen** sollten in den betreffenden Unterlagen **deutlich gekennzeichnet** sein, da anderenfalls keine zügige Bearbeitung möglich ist.
- Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den ICH-GCP-Richtlinien. Ihren Beratungen liegt gemäß der gültigen Berufsordnung die maßgebende Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki in der jeweils aktuellen Fassung zugrunde.
- Unabhängig vom Beratungsergebnis macht die Ethikkommission Sie darauf aufmerksam, dass die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer Studie beim Leiter der Studie und bei allen teilnehmenden Ärzten liegt.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ezgi ERMİŞ KAYA

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 12.01.1982

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İncirli Yabancı Dil Ağırlıklı Lise-2000

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü-2006

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Fen ve  
Matematik Alan Öğretmenliği Biyoloji Öğretmenliği-2008

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D.-2011

Doktora : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D.  
(Şubat 2011-Aralık 2015)

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

- Proje Destek Uzmanı. 2007-2011. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Geliştirme Birimi
- Araştırmacı. Mart 2013- Devam ediyor. Heidelberg Üniversite Hastanesi, Uniklinikum Spor Hekimliği Araştırma Laboratuvarı



## Yayınları (SCI ve diğer)

Yazihan N., Kacar Kocak M., Akcil E., Billur D., **Ermis E.**, Cesaretli Y., Erdem O. and Uzunlimoglu O. Chronic cadmium toxicity induces inflammation and galectin-3 expression whereas suppresses the hypoxia inducible factor mRNA expression in the liver. 01/2015. Trace Elements and Electrolytes.

Bilir A, Erguven M, **Ermis E**, Sencan M, Yazihan N. Combination of imatinib mesylate with lithium chloride and medroxyprogesterone acetate is highly active in Ishikawa endometrial carcinoma in vitro. J Gynecol Oncol. 2011; 22(4):225-32.

Erguven M, Bilir A, Yazihan N., **Ermis E**, Sabanci A, Aktas E, Aras Y, Alpman V. Decreased therapeutic effects of nescapine combined with imatinib mesylate on human glioblastoma in vitro and the effect of midkine. Cancer Cell Int. 2011 8;11(1):18.

Bas AL, Demirci S, Yazihan N., Uney K, **Ermis-Kaya E.** Nerium oleander distillate improves fat and glucose metabolism in high-fat diet- fed-streptozotocin- induced diabetic rats. Int J Endoc 2012:947187.

Karakurt O, Üreten K, Sarı M, Yazihan N., Ermis E, Ergüder I. Paraoxonase-1, malondialdehyde, mean platelet volume and atherosclerosis relationship at familial mediterranean fever. An observational study. Anadolu Kardiyol Derg. 2013 Jun;13(4):357-62.

Yazihan N., Demirci S, Bas AL, **Ermis E**, Uney K. Increased glucose uptake and insulin binding activity of Nerium Oleander in hepatocytes and adipocytes. Kafkas Univ Vet Fak Derg 19 (1): 25-30, 2013

Yilmaz T.U., Yazihan N., Dalgic A., **Ermis Kaya E.**, Salman B., Kocak M. and Akcil E. Role of ATP-dependent K channels in the effects of erythropoietin in renal ischaemia injury. Indian J Med Res 141, 2015. pp 807-815.

## **Ulusal Bildiriler:**

Yazıhan N, Baş AL, Aydın C, Kaya ş, AtaoğluH, Yener B, **Ermış E**. Hiperglisemide mononükleer hücre cevabi, 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Erzurum, 2008. Poster.

Yazıhan N, Akçıl E, Ergüven M, **Ermış E**, Bilir A, Koçak M. Imatinib mesilat ve glibenklamidin glioblastoma tedavisinde sinerjik etkisi. 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, 2009. Poster.

Yazıhan N, Akçıl E, **Ermış E**, Koçak M. Eritropoietinin renal proksimal tubuler hücrelerdeki proliferatif etkisine Kir 6x kanallarının katılımı. 35. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, 2009. Poster.

Yazıhan N, Akcil E, Kocak M, **Ermis E**. HIF-1 ve proinflamatuvar sitokinlerin kronik kadmiyuma bağlı renal hasara katılımı. 35. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Ankara, 2009. Poster.

Bambal G., Yazıhan N., Özel Demiralp D., **Ermış E**., Karsan A., Akman Ö., Ateş N.. Genetik Abusans epilepsili Wag/rij ratlarda beynin farklı bölgelerdeki proinflamatuvar sitokin düzeylerinin kiding süresiyle ilişkisi, 35. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2009. Poster

Bambal G., Yazıhan N., Özel Demiralp D, **Ermış E**., Karsan A., Ateş N. Genetik Abusans epilepsili Wag/rij sıçanlarda korteks dokusunda proinflamatuvar sitokin düzeylerinin yaşa bağlı değişimin epilepsi sürecine etkisi, 35. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2009. Poster

Yazıhan N, Kocak M, Akcil E, **Ermış E** ve Uzunalimoglu O. Kronik kadmiyum toksitesine proinflamatuvar sitokinlerin ve midkinin katılımı, 26. Ulusal Gastroenteroloji Kongresi, Ankara, 2009. Poster.

## **Uluslararası Bildiriler:**

Yazihan N, Akcil E, **Ermis E**, Kocak E. Involvement of ATP dependent K channels to proliferative effect of Erythropoietin FEPS 12-15 Kasım 2009 Slovenya. Poster.

Yazihan N, Erguven M, Akcil E, Bilir A, **Ermis E**, Kocak M. Synergic cytotoxic effect of Imatinib mesylate and glibenclamide in human glioblastoma cell line FEPS 12-15 Kasım 2009 Slovenya. Poster.

Kocak M, Yazihan N, Akcil E, **Ermis E**. Role of HIF-1 and proinflammatory cytokines in chronic cadmium toxicity, FEPS 12-15 Kasım 2009 Slovenya. Poster.

**Ermis E**, Yazihan N, Akcil E, Cokmus C. Relation of Midkine and Hypoxia Inducible Factor-1 with Cadmium Exposure In Human Hepatocyte Cell Line In Normoxic and Hypoxic Conditions. FESTEM 2010, Rusya. Sözlü bildiri.

Erguven M, Yazihan N, Sabanci A, **Ermis E**, Senyurek M, Bilir A. Imatinib mesylate plus litium chloride failed to treat glioblastoma in vitro: The effect and mechanism of midkine. 35.FEBS Congress Molecules of Life 2010 İsveç. Poster.

Yazihan N, Bas AL, Uney K, Kaya S, **Ermis E**, Savas B, Akcil E, Kocak M, Uzunalimoglu O. Usage of nerium oleander in hyperglycemia and hyperlipidemia related liver pathologies: a comparative study with anti-lipidemic and anti-hyperglycemic agents. 6. International Congress of Pathophysiology, September 2010, Kanada. Poster.

Yazihan N., Erguven M., A.L. Bas, **Ermis E.**, Bilir A., Kacar Kocak M., Akcil E., Baloglu E., Mairbeurl H. Dexamethasone Supresses Klebsiella Pneumoniae Induced Cytokine Production and Midkine Expression in Rat Lungs. FEPS (Federation of European Physiological Societies) German-Turkish joint meeting Workshop : “Lung, Macrophages, Hypoxia, Inflammation” BMBF - TUBITAK IntenC Program, 2011 İstanbul, Acta Physiologica, 203 (686): W20. Sözlü bildiri.

Yazihan N., Sahin F., **Ermis E.**, Yilmaz E., Kacar Kocak M., Akcil E., Baloglu E., Mairbeurl H. Cell Signaling and Cytokine Secretion Response Differences in Midkine Silenced and Overexpressed Rat Alveolar Macrophages. FEPS (Federation of European Physiological Societies) German-Turkish joint meeting Workshop : “Lung, Macrophages, Hypoxia, Inflammation” BMBF - TUBITAK IntenC Program, 2011 İstanbul, Acta Physiologica, 203 (686): W15. Sözlü bildiri.

Yazihan N., Sahin F., Sirin B., **Ermis E.**, Belen A., Kacar Kocak M., Cesaretli Y., Akcil E. Immune Suppressor Effect of Cadmium in Lung Alveolar Macrophage Cells. FEPS (Federation of European Physiological Societies) German-Turkish joint meeting Workshop : “Lung, Macrophages, Hypoxia, Inflammation” BMBF - TUBITAK IntenC Program, 2011 İstanbul, Acta Physiologica, 203 (686): W16. Sözlü bildiri.

**Ermis-Kaya E.**, Baloglu E., Meister M., Cebesoy S., Mairbäurl H. Effects of Lung Adenocarcinoma on Sodium Transport of Healthy Alveolar Epithelial Cells. 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society. March, 2014 Mainz, Almanya, Volume 210, Supplement 695. Poster.

**Ermis Kaya E.** Baloglu E., Meister M., Cebesoy S. and Mairbaurl H. Hypoxia-Dependent Signals From Lung Adenocarcinoma Cells Impair Na- Transport In Human Alveolar Epithel. ATS conference, May 2015, Denver, Colorado A.B.D. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 191;2015:A2035. Poster.

#### **Yer aldığı projeler:**

- Imatinibin Indometasin, Lityum, Selisiklib ve Noskapin ile kombinasyonunun T98G İnsan Glioblastoma Hücrelerine Etkisinin İn vitro İncelenmesi İstanbul Üniversitesi BAP T-988/06102006, 2007

- Vinorelbin ve Lityum klorürün SH-SY5Y nöroblastoma hücre kültürlerinde hücre büyümesi üzerine etkileri. YÖP2877, İstanbul Üniversitesi, 2008.
- Renal iskemi reperfüzyon hasarında eritropoietinin koruyucu etkisinde ATP bağımlı K kanallarının katılımı: HIF-1 ve HIF-2 mRNA ekspresyonlarına etkisi, Gazi Üniversitesi BAP, 2008.
- Renal tubuler iskemik hasarda eritropoietinin Kir 6x kanal ekspresyonuna etkisi, TUBITAK, 108S248, 2008.
- Lung, macrophages and inflammatory mediators in normoxia and hypoxia, TUBITAK-BMBF “Intensified cooperation IntenC, 2008
- Nerium oleander’in liyofilize sıvı distilatının in vitro diyabetik retinopatiyi önlemedeki etkinliğinin değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi, BAP, 2010

#### **Ödüller ve burslar:**

- Erasmus Staj Hareketliliği Programı, Heidelberg Üniversitesi Almanya, Mart-Haziran 2013
- Imatinib mesilat ve glibenklamidin glioblastoma tedavisinde sinerjik etkisi, 34. Ulusal Fizyoloji Kongresi 2009, Sözlü sunum ödülü 3. Lük
- Tubitak bursu SBAG-108S248 nolu proje 2007-2008
- Tubitak bursu Inten-C SBAG-BMBF 108262 nolu uluslar arası proje, 2008-2011