



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



DOKTORA TEZİ

**PULMONER NÖROENDOKRİN HÜCRELERİN AKCİĞER
FİBROZİSİ ÜZERİNDE MUHTEMEL ROLLERİ**

Özgecan KAYALAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

Danışman

Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

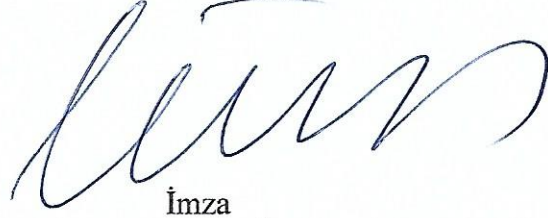
İmzası

Mart, 2019

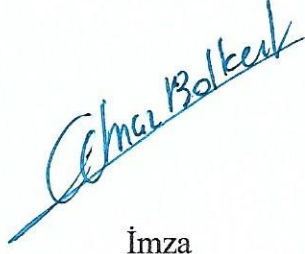
İSTANBUL

Bu çalışma 25/03/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



İmza
Prof. Dr. Füsun ÖZTAY
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Şehnaz Bolkent
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Kadir Turan
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Cihan Demirci Tansel
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



İmza
Prof. Dr. Hasan Bayram
Koç Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Doktora tezine, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33532 numaralı Doktora Tez Projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisanstan bu yana Doktora öğrenimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, bilimsel bakış açımı genişleten, özverili ve dikkatli bir şekilde mentörlüğümü üstlenen çok değerli hocam, Prof. Dr. Füsun ÖZTAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Örnek davranışlarıyla, sorumluluk bilinciyle, disipliniyle, bilimsel bakış açısı ve organizasyon kabiliyetiyle bizlere örnek olan sevgisini bizlerden esirgemeyen anabilim dalı başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e teşekkür ederim.

Doktora yeterlilik sonrası 10 aylık ilk akademik maceramda, Bana Almanya'nın Münih şehrinde Comprehensive Pneumology Center'daki laboratuvarının imkanlarını sonuna kadar açan bilimsel bakış açısı ile örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Melanie KÖNIGSHOFF'e , onun Doktora sonrası öğrencisi Dr. Sarah VIERKOTTEN ile tüm laboratuvar elemanlarına teşekkürü borç bilirim. Ayrıca Almanya'ya gitmemde önemli destek ve yardımlarından dolayı Erasmus Koordinatörümüz ve güler yüzlü hocamız Prof. Dr. Gülriz BAYÇU KAHYAOĞLU'yla birlikte ve tüm ERASMUS Ofisi çalışan ve koordinatörlerine teşekkürlerimi sunarım.

Doktoram boyunca çeşitli aşamalarda her türlü destekleriyle birlikte bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR BAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Ayşe KARATUĞ KAÇAR'a çok teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve yüksek lisans sürecinden bu yana tüm nazımı çeken değerli arkadaşlarım Uzman Biyolog Sevinç NARİN, Uzman Biyolog Öznur YILMAZ GÖKTAŞ, Uzman Biyolog Hale ÖVET KANBALOĞLU, Uzman Biyolog Ecem GÖGÜŞ'e ve grup arkadaşlarım, Uzman Biyolog Nezih BEŞİKTEPE, Uzman Biyolog Merve YILDIRIM, Biyolog Ezgi SARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yaşamım boyunca üzerimden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anlayışları, özverileri ve bana olan inançlarıyla sonuna kadar arkamda bir dağ gibi duran BABAM

Zeynel KAYALAR ve ANNEM Cennet KAYALAR ile canım kardeşlerim Özlem KAYALAR SAÇLI ve Özgün KAYALAR'a, eniştem Aydın SAÇLI'ya çok teşekkür ederim.

Son olarak, hayatıma ışığıyla, aşkıyla ve sevgisiyle yeni bir pencere açan yolum, yoldaşım ve geleceğim olan değerli eşim Yeşim KAYALAR'a çok teşekkür ederim.

Mart, 2019

Özgecan KAYALAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xiii
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1.PULMONER FİBROZİS.....	6
2.1.1. İPF Karakteristiği, Epidemiyolojisi ve Terapötik Yaklaşımlar.....	6
2.1.2. Pulmoner Fibrozis Patolojisi ve Moleküler Biyolojisi.....	8
2.1.2.1. İnflamasyon Teorisi.....	8
2.1.2.2. Anormal Yara İyileşmesi Teorisi.....	10
2.1.3. Pulmoner Fibrozisde Rol Oynayan Anahtar Hücreler ve Miyofibroblast Havuzuna Katkı Sağlayan Mekanizmalar.....	11
2.1.3.1. Pulmoner Fibrozisde Tip 2 Pnömositler ve Epitelial-Mezenkimal Geçiş.....	11
2.1.3.2. Pulmoner Fibrozisde Fibroblastlar ve Fibroblast-Miyofibroblast Farklılaşması.....	13
2.1.4. Pulmoner Fibrozisde Rol Oynayan Önemli Sinyal Yolakları.....	13
2.1.4.1 TGF- β 1/Smad Sinyal Yolağı.....	13
2.1.4.2. Wnt Sinyal Yolağı.....	16
2.2. PULMONER NÖROENDOKRİN HÜCRELER.....	17
2.2.1. Genel Özellikleri ve Fonksiyonları.....	17
2.2.2. PNEC'lerden Salınan Nöroendokrin Peptidler ve Fonksiyonları.....	20
2.2.2.1. Gastrin-Serbesleştirici Peptid.....	20

2.2.2.2. <i>Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid</i>	22
2.2.3. PNEC'lerin Akciğer Hasarı, İnflamasyon ve Pulmoner Fibrozis ile İlişkisi...	23
3. MALZEME VE YÖNTEM	24
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	24
3.1.1. A549 Hücre Hattı.....	24
3.1.2. MRC5 Hücre Hattı.....	24
3.2. HÜCRE CANLILIK TESTİ.....	25
3.3. HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ.....	26
3.4. WESTERN EMDİRİM YÖNTEMİ.....	27
3.4.1. Total Protein İzolasyonu.....	27
3.4.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini.....	28
3.4.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi.....	28
3.4.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi (Western Emdirim).....	30
3.4.5. Özgün Protein Bandlarının İşaretlenmesi, Görüntülenmesi ve Analizi.....	30
3.5. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ.....	32
3.5.1. Total RNA İzolasyonu.....	32
3.5.2. RNA Miktarının Ölçülmesi ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	32
3.5.3. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Eldesi ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	32
3.5.4. QRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri.....	33
3.6. İKİLİ İMMÜNİFLORESAN İŞARETLEME YÖNTEMİ	38
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	38
4. BULGULAR	40
4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI.....	40
4.1.1. A549 Hücrelerine Ait MTT Bulguları.....	40
4.1.2. MRC5 Hücrelerine Ait MTT Bulguları.....	42
4.2. HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ BULGULARI.....	43
4.2.1. A549 Hücrelerinin Proliferatif Yanıtı.....	43

4.2.2. MRC5 Hücrelerinin Proliferatif Yanıtı.....	45
4.3. WESTERN EMDİRİM BULGULARI.....	48
4.3.1. GRP ve CGRP ile Uyarılan A549 Hücrelerinde EMT Uyarımının Değerlendirilmesi.....	48
4.3.2. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Fibroblast-Miyofibroblast Farklılaşmasının Değerlendirilmesi.....	49
4.3.3. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde TGF- β 1/Smad Sinyal Yoluğu Proteinleri Bulguları.....	51
4.3.4. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Wnt Sinyal Yoluğu Proteinlerine Ait Bulgular	53
4.4. GEN EKSPRESYON BULGULARI.....	56
4.4.1. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Fibroblast-Miyofibroblast Farklılaşması ile İlişkili Genlere Ait Bulguları.....	56
4.4.2. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde TGF- β 1/Smad Sinyal Yoluğu ile İlişkili Genlere Ait Bulgular.....	58
4.4.3. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Wnt Sinyal Yoluğu ile İlişkili Genlere Ait Bulgular.....	60
4.4.4. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde GRP, CGRP, Reseptörleri ve G proteini Aracılı Hücre İçi Sinyal Moleküllerine Ait Gen Ekspresyon Bulguları.....	61
4.5. MİKROSKOPİ BULGULARI.....	64
4.5.1. Faz-Kontrast Mikroskopu İnceleme Bulguları.....	64
4.5.2. İkili İmmünfloresan İşaretleme Bulguları.....	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR	85
EKLER.....	1044
ÖZGEÇMİŞ.....	105

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** İnflamasyonun pulmoner fibroziste etkili olduğunu açıklayan 5 hipotezin şekilsel anlatımı. Brindgardner ve diğ., 2008'den alınmıştır.....10
- Şekil 2.2:** TGF- β /Smad2/3 sinyal yolunun şematize gösterimi. <https://www.pancreapedia.org/pathways/tgfbeta-smad>'den değiştirilmiştir.....15
- Şekil 2.3:** Wnt/ β -katenin sinyal yolunun şematize gösterimi. Wnt ligand varlığında β -katenin'in sitoplazmadaki stabilizasyonu ve Wnt/ β -katenin sinyal aktivasyonu uyarılır. Ota ve diğ., 2016'dan değiştirilmiştir.....17
- Şekil 3.1:** MTT kimyasal yapısı ve formazan kristallerine dönüşüm reaksiyonu.....26
- Şekil 4.1:** GRP uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....41
- Şekil 4.2:** CGRP uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$41
- Şekil 4.3:** TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$41
- Şekil 4.4:** GRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$42
- Şekil 4.5:** CGRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$43
- Şekil 4.6:** TGF- β uygulamalarının MRC5 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: ** $p<0,01$43
- Şekil 4.7:** GRP uygulamalarının A549 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$44
- Şekil 4.8:** CGRP uygulamalarının A549 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$45
- Şekil 4.9:** TGF- β uygulamalarının A549 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: ** $p<0,01$45
- Şekil 4.10:** GRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$46
- Şekil 4.11:** CGRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$47

- Şekil 4.12:** TGF- β uygulamalarının MRC5 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * $p < 0,05$47
- Şekil 4.13:** TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M)'nin A549 hücrelerinde EMT sürecine etkisi. α -SMA ve E-kaderin protein bandları (**a**) ile α -SMA ve E-kaderin protein seviyelerindeki değişimler gösterilmiştir (**b-e**). **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$49
- Şekil 4.14:** Şekilde TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10^{-5} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde α -SMA ve fibronektin (FN) protein bandlar (**a**) ve bu proteinlerin seviyelerine meydana gelen değişimler (**b ve c**) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$50
- Şekil 4.15:** Şekilde TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde α -SMA ve fibronektin (FN) protein bandlar (**a**) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (**b ve c**) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$50
- Şekil 4.16:** Şekilde TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10^{-5} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde total Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4 ve Smad7 protein bandları (**a**) ile bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (**b-e**) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$52
- Şekil 4.17:** TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde total Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4 ve Smad7 protein bandları (**a**) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (**b-e**) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$53
- Şekil 4.18:** TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10^{-5} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Wnt sinyal yolunda görevli olan β -katenin, aktif β -katenin (A β C), Dkk1, Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a protein bandları (**a**) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (**b-g**) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$55
- Şekil 4.19:** TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Wnt sinyal yolunda görevli olan β -katenin, Aktif β -katenin (A β C), Dkk1, Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a protein bandları (**a**) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (**b-g**) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$56
- Şekil 4.20:** TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde ACTA2 (**a**), VIM (**b**) ve COL1A1 (**c**) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. **K:** deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ olarak gösterilmektedir.....58
- Şekil 4.21:** TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde TGFBI (**a**), SMAD2 (**b**), SMAD3 (**c**), SMAD4 (**d**) ve SMAD7 (**e**) gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. **K:** deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$59

- Şekil 4.22:** TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde CTNNB1 (a), *GSK3B* (b), *AXIN* (c), *LEF* (d) ve *DKK1*(e) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. **K:** Deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05 ve **p<0,01.....61
- Şekil 4.23:** TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10^{-5} M)'nin 24., 48. ve 72. saatlerde MRC5 insan akciğer fibroblast hücrelerinde (a.) *GRP* ve (b.) *GRPR* gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **K:** Deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.....62
- Şekil 4.24:** TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M)'nin 24., 48. ve 72. saatlerde MRC5 insan akciğer fibroblast hücrelerinde (a.) *CALCA*, (b.) *CALCB* ve (c.) *CALCRL* gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **K:** Deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05.....63
- Şekil 4.25:** TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *PKA* (a), *PKCD* (b), *PKCZ* (c) ve *CREB1* (d) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimleri göstermektedir. **K:** deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05 ve **p<0,01.....64
- Şekil 4.26:** TGF- β (5ng /ml) ve GRP (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) uyarımı takip eden süreçte MRC5 hücrelerinin morfolojilerinde değişikliğe sebep olur. Faz-kontrast mikroskobu, 40X büyütme. Bar: 50 μ m.....65
- Şekil 4.27:** TGF- β (5ng /ml) ve CGRP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) uyarımı takip eden süreçte MRC5 hücrelerinin morfolojilerinde değişikliğe sebep olur. Faz-kontrast mikroskobu, 40X büyütme. Bar: 50 μ m66
- Şekil 4.28:** TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde anti- α -SMA ve anti-kollajen-1 immünoreaktivitesindeki değişimler gösterilmiştir. Hücrelerin nükleusları DAPI ile işaretlenmiştir. 40X büyütme.....67

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: SDS-PAGE jellerin hazırlanışı (2 jel için).....	29
Tablo 3.2: Western emdirim için kullanılan primer antikorlar ve sulandırma oranları.....	31
Tablo 3.3: Bir reaksiyon kalıp RNA karışımı hazırlaması.....	33
Tablo 3.4: Bir reaksiyon ters transkriptaz karışımı hazırlanması.....	33
Tablo 3.5: İnsan MRC5 hücre hatları için kullanılan primer dizileri.....	34
Tablo 3.6: QRT-PCR reaksiyonu için çalışılacak diziye özgü primer ve enzim karışımı.....	37
Tablo 3.7: QRT-PCR protokolü.....	37

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrad derece
A	: Amper
bp	: Baz çifti
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum iyonu
dk	: Dakika
g	: Relatif santrifüj kuvveti
kDa	: Kilo dalton
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
Na ⁺	: Sodyum iyonu
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
rpm	: Santrifüj rotor hızı
V	: Voltaj
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta

Kısaltmalar Açıklama

A549	: İnsan adenokarsinoma hücre hattı
AEC	: Alveolar epitel hücresi
AKT	: AKT serin/treonin kinaz
A.U.	: Arbitrary Unit
α-SMA	: Alfa-düz kas aktini
ALAT	: Latin Amerika Toraks Birliği
APC	: Adenomatosis poliposis coli proteini
ATS	: Amerikan Toraks Derneği
AβC	: Aktif β-katenin
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BMP	: Kemik morfogenezik proteini
BrdU	: Bromodeoksi üridin
BSA	: Sığır serum albumini

cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CGRP	: Kalsitonin geniyle ilişkili peptid
CGRPR	: Kalsitonin geniyle ilişkili peptid reseptörü
CK-1	: Kazein kinaz- 1
CO₂	: Karbondioksit
Ct	: Döngü eşik değeri
CTGF	: Bağ doku büyüme faktörü
DAPI	: 4',6-Diamino-2- fenilindol
DLCO	: Karbonmonoksit diffüzyon kapasitesi
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye edilmiş medyum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPBS	: Dulbecco'nun modifiye fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
DVL	: Disheveled proteini
ECM	: Ekstrasellular matriks
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epitelial büyüme faktörü
EMT	: Epitelial-mezenkimal geçiş
ERS	: Avrupa Solunum Derneği
FBS	: Fetal sığır serumu
FEV₁	: Zorlu ekspirasyon hacmi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FVC	: Zorlu vital kapasite
FZD	: Frizzled reseptör proteini
GRP	: Gastrin serbestleştirici peptid
GSK3β	: Glikojen sentaz kinaz-3 beta
H₃PO₄	: Fosforik asit
HRCT	: Yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi
HRP	: Yabanturba peroksidazı
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	: İnterlökin
İPF	: İdiyopatik pulmoner fibrozis
JRS	: Japon Solunum Derneği
LRP	: LDL ilişkili reseptör proteini
MAPK	: Mitojen ile aktive olan kinaz benzeri protein
M-CSF	: Monosit koloni sitümüle edici faktör
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MRC5	: İnsan fetal akciğer fibroblastları
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazoyil)-2,5-difeniltetrazolum bromid
NEB	: Nöroepitelial cisimcik
NSIP	: Sık görülmeyen idiyopatik pnömoni
PaO₂	: Parsiyel oksijen basıncı
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	: Plateletten kökenlenen büyüme faktörü
PI3K	: Fosfotidil inositol 3 kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PNEC	: Pulmoner nöroendokrin hücre

qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
TβR	: Transföme edici büyüme faktörü-beta reseptörü
TBS	: Trisle tamponlanmış tuz özeltisi
TBST	: Tween-20 içeren trisle tamponlanmış tuz özeltisi
TGF-β	: Transföme edici büyüme faktörü-beta
TIMP	: Metalloproteinaz inhibitörü
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
UIP	: Sık görülen idiyopatik pnömoni
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü



ÖZET

DOKTORA TEZİ

PULMONER NÖROENDOKRİN HÜCRELERİN AKCİĞER FİBROZİSİ ÜZERİNDE MUHTEMEL ROLLERİ

ÖZGECAN KAYALAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Füsun ÖZTAY

Pulmoner fibrozis, alveolar epitelde şiddetli hasar sonrası inflamasyonun artışı, geri dönüşümsüz olarak fibroblast ve miyofibroblast sayısında artış ve ekstrasellular matriks elemanlarının aşırı birikimi ile karakterize edilir. Pulmoner nöroendokrin hücreler havayollarının dallanma bölgelerinde epitelde yerleşirler ve akciğer fizyolojisinde ve biyolojisinde fonksiyon gösteren hücrelerdir. Etkilerini ürettikleri biyoamin ve peptid tabiatlı moleküller ile gerçekleştirirler. Bu hücrelerden salgılanan en önemli peptidler gastrin serbestleştirici peptid (GRP) ve kalsitonin geniyle ilişkili peptid (CGRP)'dir. Bu peptidleri içeren PNEC'lerin pulmoner fibrozisli hastaların akciğerlerinde arttığı bilinmektedir. Ancak her iki peptidin pulmoner fibrozis patogenezindeki etkileri (hücre proliferasyonu, epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve fibroblast-miyofibroblast farklılaşması) moleküler düzeyde araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, GRP ve CGRP'nin hem epitel (insan A549 epitel hücre hattı) hem de fibroblast (MRC5 insan akciğer fibroblastları) hücrelerinde proliferasyon, EMT ve fibroblast-miyofibroblast farklılaşma sürecine etkilerini tespit etmek ve bu patolojik süreçlere etkilerini hangi fibrotik sinyal yolları ve molekülleri üzerinden gerçekleştirdiklerini göstererek pulmoner fibrozisteki etkilerini ortaya koymaktır.

İnsan A549 ve MRC5 hücreleri PBS'de çözündürülmüş GRP (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), CGRP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) ve 5 ng/ml TGF- β ile uyarıldılar. Hücreler, uyarımı takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde toplandılar. Proliferatif ve fibrotik etkili dozların belirlenmesi için hücreler üzerinde MTT hücre canlılık testi ve BrdU proliferasyonu testi gerçekleştirildi. A549 hücrelerinde EMT ve MRC5 hücrelerinde miyofibroblast farklılaşması, bu süreçlerde etkili moleküllerin ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve Wnt sinyal yollarında görevli moleküllerin protein (Western emdirim) ve gen ekspresyon analizleri (qRT-PCR) ile değerlendirildi.

GRP ve CGRP'nin üç dozunda A549 ve MRC5 hücre canlılıkları üzerine toksik etkili olmadıkları belirlendi. Hücre proliferasyonu sonuçlarına göre, GRP ve CGRP'nin üç dozu da A549 hücrelerinde BrdU miktarını arttırdı. Bu petidler, MRC5 hücrelerinde ilk 24 saatte BrdU miktarını artırırken, 72. saate doğru azalttılar. GRP ve CGRP, A549 hücrelerinde EMT'yi uyarırken, MRC5 hücrelerinde fibroblastların-miyofibroblastlara farklılaşmasını uyardı. GRP, Smad4 ve Smad2/3 protein seviyelerini ve Smad2/3 aktivasyonunu arttırarak fibroblast-miyofibroblast farklılaşmasını uyardı. CGRP, Smad4 protein seviyelerini ve Smad2/3 aktivasyonunu arttırıp Smad 7 protein seviyelerini azaltarak fibroblast/miyofibroblast farklılaşmasını uyardı. GRP, fibrotik sürecin başlangıcında Wnt5a protein seviyelerini azaltıp fibrotik sürecin başından itibaren Wnt4, Wnt7a ve total β -katenin protein seviyelerini arttırarak β -katenin aktivasyonunu uyardı. CGRP, fibrotik sürecinde Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a protein seviyelerini dengeleyerek β -katenin aktivasyonunu uyardı. GRP, *ACTA2*, *VIM* ve *COL1A1* genlerinin ekspresyonlarını uyarırken CGRP ise *ACTA2* ve *COL1A1* gen ekspresyonunu uyardı. GRP, *SMAD2* geninin transkripsiyonunu değiştirmezken *TGFBI*, *SMAD4* ve *SMAD3* genlerinin transkripsiyonunu uyardı. *SMAD7* transkripsiyonunu azalttı. CGRP, *TGFBI*, *SMAD2*, *SMAD3* ve *SMAD4* genlerinin transkripsiyonunu arttırırken *SMAD7* geninin transkripsiyonunu azalttı. GRP, *CTNNT1* gen ekspresyonunu arttırıp *DKK1* gen ekspresyonunu azalttı. CGRP, *CTNNT1*, *GSK3B*, *AXIN* ve *LEF1* gen ekspresyonunu değiştirmezken *DKK1* transkripsiyonunu azalttı. GRP'nin kendi ligand (*GRP*) gen ekspresyonunu artırırken reseptör (*GRPR*) gen ekspresyonunu değiştiremedi. CGRP, *CALCB* gen ekspresyonunu değiştirmezken *CALCA* ve *CALCB* gen ekspresyonlarını arttırdı. TGF- β , GRP'nin ligand ve reseptör gen ekspresyonlarını artırırken CGRP'nin ligand ve reseptör gen ekspresyonları üzerinde etkili değildi. GRP uygulamaları MRC5 hücrelerinde, protein kinaz C-delta (*PKCD*) ve *PKCZ* genlerinin ekspresyonlarını etkilerken, protein kinaz A (*PKA*) ve *CREB1* gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadı. CGRP uygulamaları MRC5 hücrelerinde, *PKA* ve *PKCZ* genlerinin ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken, deneyin 0. saatiyle karşılaştırıldığında *PKCD* gen ekspresyonunu 72. saatte ($p < 0,05$) anlamlı düzeylerde arttırdı.

Bulgularımız, GRP ve CGRP'nin, MRC5 fibroblast hücrelerinde doza bağlı olarak hücre proliferasyonu ve bu hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını uyarırken, A549 hücrelerinde sadece hücre proliferasyonunu uyarma yönünde etkisini göstermektedir. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast miyofibroblast farklılaşması yanısıra, zamana bağlı olarak kollajen (gen ve protein) ve fibronektin protein sentezini uyarılmaktadır. Ek olarak, GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde miyofibroblast farklılaşması ve ECM elemanlarının üretimini Smad bağımlı TGF- β ve Wnt sinyal aktivasyonu aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Ayrıca, GRP ve CGRP, MRC5 hücrelerinde Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a ligandları aracılığıyla miyofibroblast farklılaşmasını kontrol etmektedir. Tüm bu sonuçların yanında, GRP ve CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *PKCZ* gen ekspresyonunda anlamlı artışlar ve *PKA* gen ekspresyonunda anlamlı azalışlar, bu hücrelerde TGF- β ve Wnt sinyallerinin aktivasyonuna katkı sağlar. Sonuç olarak, GRP ve CGRP pulmoner fibrozisin tedavisinde hedef moleküllerdir. GRP ve CGRP sinyallerinin inhalasyon yoluyla verilen çeşitli spesifik inhibitörler, antagonistler ve siRNA uygulamaları tarafından azaltılmasını pulmoner fibrozisin geriletmesinde potansiyel bir terapi olarak önermekteyiz. *In vitro* deneylerden elde ettiğimiz sonuçların *in vivo* deneyler ile doğrulanması bu moleküllerin terapötik olarak kullanılma şansını arttıracaktır.

Mart 2019, 129 sayfa.

Anahtar kelimeler: PNEC, pulmoner fibrozis, GRP, CGRP, TGF- β 1/Smad sinyal yolağı, Wnt sinyal yolağı, EMT, fibroblast-miyofibroblast farklılaşması.



SUMMARY

PHD THESIS

POSSIBLE ROLES OF PULMONARY NEUROENDOCRINE CELLS ON PULMONARY FIBROSIS

OZGECAN KAYALAR

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Fusun OZTAY

Pulmonary fibrosis is characterized by increased inflammation after a severe injury in the alveolar epithelium, an increase in the number of fibroblasts and myofibroblasts irreversibly and excessive accumulation of extracellular matrix components. Pulmonary neuroendocrine cells are located in the epithelium at the branching regions of the airways and function in lung physiology and biology. They occur their effects via bioamines and peptide-based molecules. The most important peptides released from these cells are the gastrin releasing peptide (GRP) and the calcitonin gene associated peptide (CGRP). It is known that the PNECs containing these peptides increase in the lungs of patients with pulmonary fibrosis. However, the effects of both peptides on the pathogenesis of pulmonary fibrosis (cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and fibroblast-myofibroblast differentiation) have not been investigated at the molecular level. The purposes of this study were to determine the effects of GRP and CGRP on the proliferation, EMT and fibroblast-myofibroblast differentiation processes in both epithelium (human A549 epithelial cell line) and fibroblast (MRC5 human lung fibroblasts) cells and to explain their effects on these pathological processes. Additionally, it was to show their effect on pulmonary fibrosis.

Human A549 and MRC5 cells were stimulated with GRP (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M), CGRP (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M) and 5 ng /ml TGF- β dissolved in PBS. Cells were harvested at 24th, 48th and 72th hours following stimulation. For the determination of proliferative and fibrotic effective doses, the tests of MTT cell viability and BrdU proliferation were performed on the cells. We were evaluated myofibroblast differentiation in MRC5 cells

and EMT in A549 cells by protein (s) and gene expression analyses (qRT-PCR) of the molecules that are active in these processes, and transforming growth factor- β (TGF- β) and Wnt signaling pathways.

Three doses of GRP and CGRP were not toxic on cell viability of A549 and MRC5. According to cell proliferation results, three doses of GRP and CGRP increased the amount of BrdU in A549 cells. These peptides increased the amount of BrdU in MRC5 cells in the first 24 hours while decreasing to 72 hours. While GRP and CGRP did not stimulate EMT in A549 cells, they stimulated the differentiation of MRC5s into myofibroblasts. GRP induced fibroblast-myofibroblast differentiation by increasing Smad4 and Smad2/3 protein levels, and Smad2/3 activation. CGRP stimulated fibroblast/myofibroblast differentiation by increasing Smad4 protein levels and Smad2/3 activation and decreasing Smad7 protein levels. GRP decreased Wnt5a protein levels at the beginning of the fibrotic process and has stimulated β -catenin activation by increasing Wnt4, Wnt7a and total β -catenin protein levels since the beginning of the fibrotic process. CGRP induced β -catenin activation by balancing Wnt4, Wnt5a and Wnt7a protein levels in the fibrotic process. GRP stimulated the expression of *ACTA2*, *VIM*, and *COL1A1* genes, while CGRP induced *ACTA2* and *COL1A1* gene expression. GRP did not alter the transcription of the *SMAD2* gene but stimulated the transcription of *TGFBI*, *SMAD4*, and *SMAD3* genes. Furthermore, it reduced the transcription of *SMAD7*. CGRP enhanced the transcription of *TGFBI*, *SMAD2*, *SMAD3*, and *SMAD4* genes while reducing the transcription of the *SMAD7* gene. GRP increased *CTNNB1* gene expression and reduced *DKK1* gene expression. CGRP did not alter *CTNNB1*, *GSK3B*, *AXIN*, and *LEF1* gene expression while reducing *DKK1* transcription. GRP increased the own ligand (*GRP*) gene expression while it did not change the receptor (*GRPR*) gene expression. CGRP did not alter *CALCB* gene expression but increased *CALCA* and *CALCB* gene expression. TGF- β increased the ligand and receptor gene expression of GRP, but not the ligand and receptor gene expression of CGRP. GRP applications did not cause a significant change in protein kinase A (PKA) and *CREB1* gene expressions while affecting the expression of *PKCD* and *PKCZ* in MRC5 cells. In the study, CGRP significantly increased gene expression of *PKCD* in the 72th h ($p < 0.05$) when compared to the 0th h. However, it did not significantly change in the gene expressions of *PKA*, *PKCZ* and *CREB1*.

Our results show that GRP and CGRP induce cell proliferation and differentiation of MRC5 into myofibroblasts, whereas they only affect cell proliferation in A549 cells. GRP and CGRP stimulate myofibroblast differentiation, as well as time-dependent collagen (gene and protein) and fibronectin protein synthesis in MRC5 fibroblast. In addition, GRP and CGRP perform myofibroblast differentiation and production of ECM elements in MRC5 fibroblast cells via Smad-dependent TGF- β and Wnt signal activation. Furthermore, GRP and CGRP regulate myofibroblast differentiation through Wnt4, Wnt5a and Wnt7a ligands in MRC5 cells. In addition to all these results, significant increases in *PKCZ* gene expression in MRC5 cells induced by GRP and CGRP and significant decreases in *PKA* gene expression contribute to the activation of TGF- β and Wnt signals in these cells. In conclusion, GRP and CGRP are target molecules in the treatment of pulmonary fibrosis. Reduction of GRP and CGRP signals by various specific inhibitors, antagonists and siRNA administration by inhalation is recommended as a

potential therapy in the regression of pulmonary fibrosis. Verification of the results, we obtained from *in vitro* experiments, by *in vivo* experiments would increase the chances of these molecules to be used therapeutically.

March 2019, 129 pages.

Keywords: PNEC, pulmonary fibrosis, GRP, CGRP, TGF- β 1/Smad signal pathway, Wnt signal pathway, EMT, fibroblast-myofibroblast differentiation



GİRİŞ

Pulmoner fibrozis, akciğerlerde, fibroblast aktivasyonu, miyofibroblast sayısında artış, fibronektin, kollajen, tenaskin-C, hiyaluronik asit, heparan sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat ve kondritin sülfat gibi matriks glikozaminoglikanları ile versikan, biglikan, sindekan, dekorin ve fibromodulin gibi matriks proteoglikanlarının aşırı üretimi ve ekstrasellular matriks (ECM)'de birikimiyle karakterize edilir (Westergren-Thorssen ve diğ., 1993; Venkatesan ve diğ., 2002 ve 2011). Pulmoner fibrozisde, fibrotik sinyallere cevap olarak yara bölgelerinde skar doku oluşumu gözlenir, akciğerler elastikiyetlerini kaybederler, solunum fonksiyonları bozulur ve alveolar epitel hasarı nedeniyle kanın oksijenlenmesi azalır (Fernandez ve diğ., 2015). Pulmoner fibrozis iyonize radyasyon, asbest, silika, metal tozları, bakteriyel ve viral maruziyetler, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar (bleomisin, sulfasalazin, nitrofurantoin, amiodoran, metotreksat, propranolol ve oksaliptatin gibi), gastro-özofageal reflü, travmatik yaralanmalar, dokuda gelişen şiddetli inflamasyon, allerjik yanıtlar ve otoimmün reaksiyon gibi etmenlerce tetiklenebilir (Scott ve diğ., 1990; Billings ve Howard, 1994; Hubbard ve diğ., 1996; Denham ve Heuer-Jensen, 2002; Kelly ve diğ., 2002; Fubini ve Hubbard, 2003; Chen ve Stubbe, 2005; Harari ve Caminati, 2010).

İdiyopatik pulmoner fibrozis (İPF), pulmoner fibrozisin görüldüğü, nedeni bilinmeyen olağan interstisiyel pnömoni formunda bir interstisiyel akciğer hastalığıdır. Erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanır. Yaşla birlikte insidansı artar. İPF, ilerleyici tipte genellikle ölümlü sonuçlanan agresif bir hastalıktır. Hastalığa yakalan bireyler ortalama 2,5-3,5 yıl içinde ölmektedirler. Enteresan bir şekilde, İPF kaynaklı ölüm oranının kış aylarında arttığı bildirilmektedir (Olson ve diğ., 2009). Amerika'da bir yıl içinde yeni İPF'li hasta sayısı 200,000 iken, ölen İPF'li hasta sayısı 40,000 olarak ifade edilmektedir (Raghu ve diğ., 2006; Swigris ve diğ., 2012; Margaritopoulos ve diğ., 2016). Marshall ve diğ. (2018), Dünya Sağlık Örgütü'nün 2001-2013 yılları arasında gerçekleşen mortalite verilerini tarayıp analiz ettikleri çalışmalarında, İPF'in tüm Avrupa genelinde erkek ve kadınlarda artmasına karşın, erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görüldüğü ve Avrupa'da en çok İPF'li hasta kaybının İngiltere, Finlandiya, Danimarka, Portekiz, Hollanda, Belçika, İspanya ve Almanya'da gözlemlendiği

rapor edilmektedir. Türkiye’de de İPF’li hasta kayıpları her yıl hızlı bir şekilde artmaktadır (Musellim ve diğ., 2014). Ülkemizde artan hasta kayıpları ve ithal ilaçlarla yapılan yüksek maliyetli tedavi masrafları (yaklaşık aylık 25,000 TL) büyük bir sosyo-ekonomik problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

İPF’in geleneksel tedavisinde kortikosteroidlerle birlikte çeşitli immün baskılayıcı ajanlar hastalara kontrollü olarak uygulanmaktadır. Ancak, bu ilaçların hastalığın seyrinde ve pulmoner fonksiyonların iyileştirilmesinde olumlu etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Son yıllarda, 2013 ve 2014 yıllarından beri, reseptör ve sitoplazmik tirozin kinaz inhibitörlerinden nintedanib ve çeşitli fibrotik moleküllerin ekspresyonunu azaltan ve anti-inflammatuvar ajan olan pirfenidon, İPF tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Noble ve diğ., 2011; King ve diğ., 2014; Richeldi ve diğ., 2014). Ancak, bu ilaçların İPF’li hastaların solunum fonksiyonları üzerine olumlu etkileri olsa da her iki ilaç da ishal, bulantı ve güneş ışığına karşı hassasiyetin gelişmesi gibi ciddi yan etkileri nedeniyle hastalar üzerinde kontrollü olarak kullanılmaktadırlar (Kreuter ve diğ., 2015; Okutan ve Ayten, 2017). Hastalığın yavaş, orta ve hızlı seyirli olmak üzere heterojen fenotiplerde gelişebilmesi nedeniyle, bu ilaçlar bazı hastalarda beklenen etkileri gösterememektedir. Çok yeni olarak bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan farelere bir kanser ilacı olan ikinci nesil bir tirozin kinaz inhibitörü olan dasatinibin uygulanması ile fibrotik akciğerde fibroblast çoğalmasının, kollajen üretimi ve birikiminin ve fibrotik alanların azaldığı görülmüştür (Yılmaz ve diğ., 2015). Ayrıca, klinikte akciğer kanserinin tedavisinde kullanılan dasatinibin hem silikozis hem de sklerodermalı hastalar üzerindeki faz çalışmaları başlamıştır (Cruz ve diğ., 2016; Martyanov ve diğ., 2017). Ancak, dasatinib de ishal, plöral efüzyon, dispne gibi yan etkilere neden olabilmektedir. Son olarak C57BL6 fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, kanser tedavisinde kullanılmaya başlanan bosutinibin silika ile uyarılan pulmoner fibrozisi geriletmediği saptanmıştır. Üstelik bu anti-fibrotik etkiyi, birinci ve ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin gerçekleştirdiğinden daha az yan etki ile göstermektedir. Üçüncü nesil, çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörü olarak tanımlanan bosutinib, *in vivo*’da inflamasyonu ve fibrotik yanıtları azaltarak fibrozisi geriletmektedir (Carneiro ve diğ., 2017). Ancak, bosutinibin İPF tedavisinde klinik denemeleri henüz başlamamıştır. İPF’de mevcut ilaç denemelerinin tedavide yetersiz kalması ve önerilen ilaçların ciddi yan etkilerinin olması, yan etkisi az veya hiç olmayan çok daha etkili yeni ilaç arayışlarını teşvik etmektedir. Amerika Toraks Derneği (ATS) ve Avrupa Solunum Derneğinin (ERS) 2002 yılında yayınladığı sonuç bildirisinde

mevcut terapötik ajanların etkisinin ve kullanımının standardize edilmesi ve ayrıca yeni terapötik yaklaşımların değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir.

Pulmoner fibrozisin moleküler mekanizmalarını çözümlenmeye yönelik çalışmalarda, bugüne kadar fibrozis sürecinde etkili çeşitli moleküller ve sinyal yolları ortaya çıkarılmış, bu sinyal yollarını hedefleyen bazı inhibitör moleküller anti-fibrotik ajanlar olarak önerilmiştir. Hala İPF tedavisinde, kesin etkili bir terapötik ajanın bulunamaması, bu süreçte etkili henüz keşfedilmemiş yeni molekül ve sinyal yollarının olabileceğini düşündürmektedir. Havayolu epitelinde yer alan pulmoner nöroendokrin hücre (**PNEC**)'ler, akciğer gelişimi sırasında ilk farklılaşan epitel hücreleridir (Reynolds ve diğ., 2000). PNEC'ler solunum yolu epitelinde silli hücreler, goblet hücreleri ve pnömositlerin aralarında, epitelde yan yana veya üst üste olacak şekilde gruplar halinde çoğunlukla epitel bazalinde bulunurlar. PNEC'ler, gastrin serbestleştirici peptid (**GRP**), kalsitonin geni ile ilişkili peptid (**CGRP**) ve serotonin gibi biyojenik amin, büyüme faktörü ve mitojenik özellikli çok sayıda biyoaktif peptidi üretip hücre dışına salgılamaktadırlar. Bu biyoaktif peptidler, yakın çevrelerinde bulunan epitel ve bağ dokularındaki hedef hücrelerinin biyolojilerini parakrin olarak kontrol ederler ve akciğer gelişimi, büyümesi, onarımı ve fizyolojisinde etkili olurlar (Oztay, 2006 ve 2008). Bu hücreler parakrin etkilerinin yanı sıra salgı içeriklerini yakınlarında yer alan kılcal damarlara vererek, endokrin yolla da uzak bölgelerdeki hedef hücreleri üzerinde etki gösterebilirler (Cutz, 1997, Liu ve diğ., 2014). Diğer yandan, PNEC'lerin pulmoner fibrozisin de dahil olduğu çeşitli interstisyel akciğer hastalıklarında etkili olduklarına dair sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalar daha çok mikroskopik gözlemlere dayalı olup, 1980'li yıllarda yapılmıştır. PNEC'ler bronkopulmoner displazi, ani yeni doğan ölüm sendromu, akut akciğer hasarında, naftalin ile uyarılan akciğer hasarında, akciğer kistik fibrozisde, kronik obstruktif akciğer hastalığında, astımda, akciğer kanserinde ve pulmoner fibrozisli interstisyel akciğer hastalığında hiperplazik ve hipertrofik özellikler gösterirler. Kronik bronşit ve amfizemin dahil olduğu kronik inflamasyon ve/veya fibrozisle karakterize olan akciğer patolojilerinde PNEC sayısında veya hiperplazisinde bir artış rapor edilmektedir (Gosney ve diğ., 1989). Ayrıca, olağan interstisyel pnömoni (**UIP**), spesifik olmayan interstisyel pnömoni (**NSIP**), hipersensitivite pnömonisi ve kollajen vasküler hastalıklı interstisyel pnömonilerin dahil olduğu interstisyel pnömonilerin çeşitli formlarında PNEC'lerin sayılarının hemen hemen iki kat arttığı rapor edilmiştir (Ito ve diğ., 2002). Ancak, bu çalışmalarda PNEC'lerden salınan hangi peptidlerin hangi moleküler mekanizmalarla akciğerde fibrotik yanıt oluşturabileceği araştırılmamıştır.

PNEC'lerin salgıladıkları peptidler aracılığı ile pulmoner fibrozise neden olabileceğini gösteren az sayıda deneysel çalışma vardır. Fibroblast/miyofibroblast çoğalması, fibroblast-miyofibroblast farklılaşması ve matris elemanlarının ECM'de birikimi pulmoner fibrozisin karakteristik özellikleridir. Bu özellikler, fibroblast büyüme faktörü (**FGF**) (Guzy ve diğ., 2017), bağ doku büyüme faktörü (**CTGF**) (Huang ve diğ., 2016), plateletten kökenlenen büyüme faktörü (**PDGF**) (Dadrach ve diğ., 2015), vasküler endotelial büyüme faktörü (**VEGF**) (Barratt ve diğ., 2018), transforme edici büyüme faktörü-beta (**TGF- β**) (Stewart ve diğ., 2018), tümör nekroz faktör-alfa (**TNF- α**) (Hou ve diğ., 2018) gibi pek çok molekül tarafından uyarılmakta ve düzenlenmektedir. PNEC'lerde üretilen peptidlerin bu fibrotik süreçlerdeki etkileri detaylı olarak araştırılmamıştır. Fetal maymun ve yetişkin sıçan akciğerlerinde yapılan çalışmalar, GRP ve CGRP'nin alveolar epitel hücreleri (**AEC**) ve mezenkimal hücre proliferasyonunu uyarabildiğini göstermektedir (Emanuel ve diğ., 1999; Kawanami ve diğ., 2009). Bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan FVL/NJ farelerde CGRP içeren PNEC'lerin sayıca arttığı saptanmış ve bu artış pulmoner fibrozisle ilişkilendirilmiştir (Liu ve diğ., 2014). Bir başka çalışmada yeni doğan fare akciğerinde eksojen GRP'nin miyofibroblast proliferasyonunu uyararak, alveolar duvar kalınlığını arttırdığı gösterilmiştir (Ashour ve diğ., 2006). Zhou ve diğ. (2013), iyonize radyasyon ile pulmoner fibrozisi uyarılan C57BL6 farelerde GRP salgılanmasının, GRP içeren PNEC sayısının, makrofaj sayısının, alfa-düz kas aktin (**α -SMA**) immunoreaktivitesinin ve p-Smad2/3 immunoreaktif hücre sayısının arttığını gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada GRP reseptör inhibitörü aracılığı ile GRP sinyalinin kesilmesinin GRP pozitif PNEC ve makrofaj sayısının, α -SMA ve p-Smad2/3 immünoreaktif hücre sayısının azalmasına neden olduğu saptanmıştır. PNEC'lerden salınan peptidlerin pulmoner fibrozisle ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar, fibrotik yanıt oluşumunda rol oynayan moleküler mekanizmaları açıklamada yetersiz kalmıştır.

Yukarıda sunulan veriler ışığında, PNEC'lerin akciğerde dağılımı, yerleşimi ve salgıladıkları GRP ve CGRP aracılığı ile pnömosit ve/veya fibroblast çoğalmasını, miyofibroblast farklılaşmasını uyararak pulmoner fibroziste aktif rol oynayabilecekleri düşünülebilir. Pulmoner fibrozisin geriletmesinde etkili bir terapötik ajan arayışının devam etmesi ve PNEC'lerin salgılanan peptidlerin pulmoner fibrozis sürecindeki etkilerinin moleküler düzeyde araştırılmaması, projenin konusu, amaç ve araştırma yöntemlerinin belirlenmesinde temel oluşturmuştur. Bu doğrultuda çalışmamızda, PNEC'lerin salgıladığı GRP ve CGRP peptidlerinin proliferatif ve fibrotik etkileri insan adenokarsinoma hücre hattı, (**A549**, tip 2

pnömosit benzeri hücreler) ve fetal insan normal akciğer fibroblast hücre hattı (**MRC5**) üzerinde test edilmiştir. Bu peptidlerin fibrotik yanıt oluşturmadaki muhtemel rolleri ve her iki hücre tipinde fibrozise katkı sağlayan Smad-bağımlı TGF- β 1 ve Wnt sinyal yolları ile ilişkilendirilerek ilk kez araştırılmış ve açıklanmaya çalışılmıştır. Proje kapsamında GRP ve CGRP ile uyarılan A549 ve MRC5 hücre hatlarında, hücrelerin proliferatif yanıtı, miyofibroblastlara farklılaşma dereceleri ve bu süreçte etkili sinyal yolları ile olan etkileşimleri moleküler düzeyde araştırılmıştır. Bu çalışmayla ulaşılmak istenen hedefler şöyle sıralanabilir:

1. GRP ve CGRP'nin A549 ve MRC5 hücreleri üzerinde proliferatif yanıt oluşturup oluşturmadığı test etmek,
2. GRP ve CGRP'nin A549 ve MRC5 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmalarını uyarıp uyarmadığını incelemek,
3. GRP ve CGRP'nin bu süreçlerdeki rollerini, hangi sinyal yolları ve moleküller üzerinden gerçekleştirdiklerini belirlemek,
4. Pulmoner fibrozisin moleküler patolojisinde etkili sinyal yollarına ek olarak yeni sinyal yollarının (GRP ve CGRP sinyalleme) muhtemel katkısını göstermek.
5. GRP ve CGRP moleküllerini pulmoner fibroziste etkili potansiyel moleküller olarak önermek ve buna uygun yeni tedavi yaklaşımları sunmak.

GENEL KISIMLAR

2.1. PULMONER FİBROZİS

2.1.1. İPF Karakteristiği, Epidemiyolojisi ve Terapötik Yaklaşımlar

İPF, akciğer mimarisinin geri dönüşümsüz bozulmasıyla sonuçlanan ilerleyici tipte ve sıklıkla öldürücü olan kronik bir akciğer hastalığıdır. ATS ve ERS tarafından 2002 yılında yayınlanan ortak bildiriye İPF, yedi tipten oluşan idiopatik interstisyel pnömoni hastalık grubunun bir üyesi olarak sınıflandırılır. Hastalığın etiyojisi halen yeterince bilinmemektedir. Önceleri hastalığın kontrol altına alınamayan bir inflamasyon sonucunda geliştiği düşünülmekteydi. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarla inflamasyon olmadan da fibrozisin gelişebildiğinin gösterilmesiyle bu teoriden uzaklaşıldı (Xu ve diğ., 2003). ATS, ERS, Japon Solunum Derneği (**JRS**), Latin Amerika Toraks Birliği (**ALAT**)'nin 2011 ve 2018 yılında yayınladığı kanıta dayalı İPF tanısı rehberinde bir akciğer hastalığının İPF tanısı alabilmesinde bazı kriterler bulunmaktadır (Raghu ve diğ., 2011 ve 2018). Bu kriterler arasında en önemlisi hastalığın yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (**HRCT**) sonuçlarının incelenmesi sonucunda UIP paterni taşıyıp taşımadığının belirlenmesidir. UIP paterni, subplöral ve bazal baskınlığı, retikular anormallikler ve traksiyon bronjektazisi ile veya tek başına bal beteği görünümünün varlığını içerir. İPF tanısında akciğerde UIP paterninin varlığı belirleyicidir. İPF tanısı, vital kapasitenin azalması, **FEV₁/FVC** oranında artış, hava yolu kısıtlaması, bozulmuş gaz değişimi değerleri (O_2 için alveolar-arteriyel basınç farkında artış, dinlenme ve egzersiz halinde parsiyel oksijen basıncı (**PaO₂**) azalması ile karbonmonoksit difüzyon kapasitesi (**DLCO**) seviyelerinde azalma) gibi önemli kriterler içermektedir (Raghu ve diğ., 2011). İPF'de mortalite riskini arttıran bazal risk faktörleri arasında dispnenin varlığı, DLCO değerlerinin %40'ın altında olması, 6 dakika yürüme testinde desatürasyonun %88 ve altında olması, HRCT'de bal peteği görünümünün varlığı ve pulmoner hipertansiyon bulunmaktadır. Dispne seviyelerinin artışı, FVC'de %10 ve altı seviyelere kadar azalma, DLCO'nun %15 ve altı seviyelere azalması ve HRCT'de fibrozisin kötüleşmesi, hastalığın ilerleyici yönde geliştiğini gösterir (ATS ve ERS, 2002). Son yıllarda hastalığın tanısında ve sınıflandırılmasında ilerlemeler sağlanmasına karşın, hastalığın tedavisinde büyük bir başarı elde edilememiştir. Hastaların büyük bir kısmı tanı konulduktan sonra, 5 yıl içerisinde kaybedilmektedir (Raghu ve diğ., 2011).

İPF tanısının zor ve insidansının düşük olması nedeniyle bu hastalık grubunda epidemiyolojik çalışma sayısı kısıtlıdır. İPF dünyada her 100,000 insanın 27-29'unda gözlenmekte ve 100,000 insanın 7-11'inde ölümlerle sonuçlanmaktadır (Nalysnyk ve diğ., 2012). Amerika Birleşik Devletleri'nde İPF insidansı 100,000 insanın 7-16'sında gözlemlenmiştir (Raghu ve diğ., 2006). Birleşik Krallık'ta 2008'de İPF insidansı yılda 100,000'de 7-8 arasındadır (Navaratnam ve diğ., 2011). Avrupa'da İPF prevalansı 100,000'de 21-2 arasındadır ve yıllık insidansı 7-8 arasındadır (Nalysnyk ve diğ., 2012). Türk Solunum Dergisi tarafından 2011 yılında yayınlanan bir derlemede, Türkiye'de bu hastalığın insidansı erkeklerde 10,7/100,000/yıl ve kadınlarda 7,4/100,000/yıl, prevalansı ise erkeklerde 20/100,000/yıl ve kadınlarda 13/100,000/yıl olarak bildirilmiştir (Okutan ve Çalışkan, 2011). Hastalığın prevalans ve insidansı yaşla artar; genellikle 60-80 yaşları arasında görülür (Reynolds, 1998). İPF gelişme riski sigara kullanımıyla artar. İPF tanısı konulduktan sonra ortalama yaşam süresi 2,5-3,5 yıl arasında olup, 5 yıllık sakalım %20 düzeyindedir (Okutan ve Çalışkan, 2011). Ülkemizde ise İPF'nin görülme insidansı 4,9/100,000/yıl olarak rapor edilmiştir (Musellim ve diğ., 2014).

İPF patolojik olarak olağan pnömoni paterni ile karakterizedir. İdiyopatik interstisiyel pnömoniler arasında en sık görülenidir. İPF, cinsiyet ve yaşlanma arasında doğrudan bir ilişki vardır. İPF görülme oranı erkeklerde kadınlara göre 1,4 kat daha fazladır (Khalil ve diğ., 2004). İPF'in insidansı ise çoğunlukla yaşla birlikte artmaktadır ve hastaların büyük çoğunluğu 60 ve üzeri yaşlardadır. Sigara kullanımı, genetik faktörler, infeksiyöz ajanlar ve çevresel faktörler (metal tozları, odun tozu, kuş besleme, kuaförlük, taşçılık gibi), gastro-özofagiyal reflü, otoimmünite ve ilaç maruziyeti (Bleomisin gibi) bu hastalıkla ilişkili potansiyel risk faktörlerinden bazılarıdır.

Geleneksel tedavide kortikosteroidler, azatioprin, siklofosfamid, siklosporin gibi immünosupresif ajanlar hastalara kontrollü olarak uygulanmaktadır. Ancak bu ilaçların hastalığın seyrinde ve pulmoner fonksiyonların iyileştirilmesinde olumlu etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir (ATS ve ERS, 2002).

Pulmoner fibrozisin önlenmesine yönelik yapılan deneysel çalışmalarda fibrozis, bleomisinin intratrakeal yoldan kemirgenlere verilmesi ile uyarılmaktadır. Bu deneysel model, yapısal ve biyokimyasal özellikleri bakımından insanlarda gözlenen İPF hastalığı ile benzerlik göstermesi nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir (Raghu ve diğ., 2006). Bleomisin ile fibrozisi uyarılan kemirgen akciğerlerinde hastalığın moleküler mekanizmaları açıklanmaya, fibrozisin

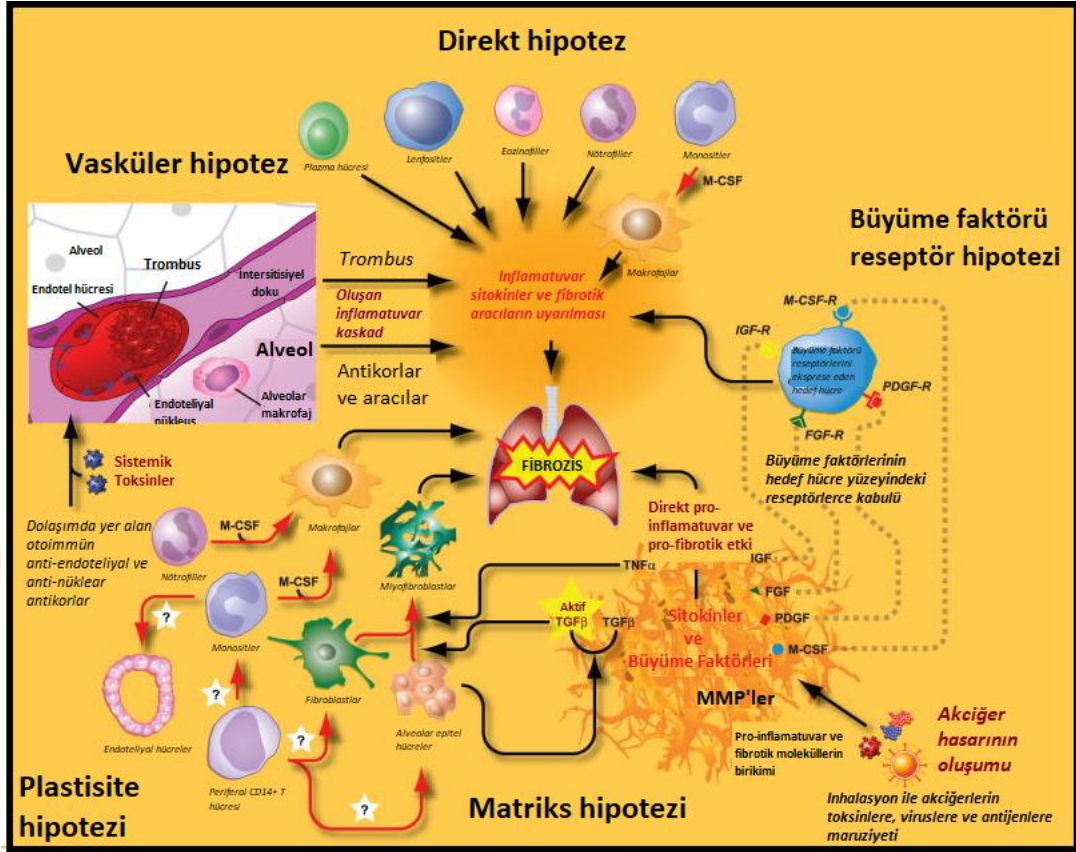
önlenmesi ve geriletilmesine çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalarda anti-fibrotik ajanlar olarak çeşitli antioksidanlar (Boyacı ve diğ., 2006), losartan ve valsartan gibi angiotensin reseptör blokerleri (Yao ve diğ., 2006), antikoagulan maddeler (Gunther ve diğ., 2003; Shimizu ve diğ., 2003), antibiyotikler (Ma ve diğ., 2002; Azuma ve diğ., 2007) sitokin antikorları (Giri ve diğ., 1993; Maeyama ve diğ., 2001), kortikosteroidler (Richeldi ve diğ., 2003; Papiris ve diğ., 2012), jelatin ajanlar (Ammar ve diğ., 2006) önerilmektedir. Ancak, bu maddelerin pek çoğu klinikte test edilmemiştir. Interferon (Gurujeyalakkshmi ve Giri, 1995; Mizuno ve diğ., 2005), imatinib (tirozin kinaz inhibitörü) (Daniels ve diğ., 2010), bosentan ve macicentan (endotelin-1 reseptör blokerleri) (King ve diğ., 2008 ve 2011; Raghu ve diğ., 2013) İPF'li hastalarda denenmiştir, ancak hastalığın tedavisinde etkili olmadıkları gözlemlenmiştir. Bugün itibariyle İPF'in tedavisinde pirfenidon ve nintedanib faz III çalışmalarının sonuçlarına göre klinikte kullanılmaya başlanmıştır, ancak hastalığın geriletilmesi ve iyileşme noktasında halen yetersiz kalmaktadırlar. Nintedanib (BIBF1120), anjiyogenezde rol alan üç büyük sinyal yolunu inhibe ettiği için üçlü angiokinaz inhibitörü olarak da adlandırılan güçlü bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Nintedanib, Src ve Flt-3 kinazların yanısıra VEGF, FGF ve PDGF reseptör kinazlar aracılı pro-anjiyojenik ve pro-fibrotik sinyal yollarını hedefler (Roth ve diğ., 2015). Pirfenidon, fibroblast proliferasyonunun yanısıra TGF- β ile indüklenen α -SMA ve pro-kollajen-1 mRNA ve protein seviyelerini azaltır. Bu etkisini özellikle pirfenidon TGF- β ile indüklenen ve bu sinyal yolunun anahtar faktörlerinden Smad3, p38 ve AKT'nin fosforilasyonunu azaltarak gerçekleştirir. Ek olarak, pirfenidon bu etkisiyle fibroblastların-miyofibroblastlara farklılaşmasını engeller (Conte ve diğ., 2014). İPF tedavisinde mevcut terapötik ajanların etkisinin ve kullanımının standardize edilmesi ve yeni terapötik yaklaşımların değerlendirilmesine hala ihtiyaç duyulmaktadır (ATS ve ERS, 2002; Raghu ve diğ., 2011).

2.1.2. Pulmoner Fibrozis Patolojisi ve Moleküler Biyolojisi

2.1.2.1. İnflamasyon Teorisi

İnflamasyonun İPF'de görülen fibrozis üzerindeki rolü hakkındaki tartışmalar 2002'den bu yana devam etmektedir (Gauldie, 2002; Strieter, 2002). Başlangıçta, uzmanlar akciğerlerin bilinmeyen etmenlere maruz kalması sonrasında alveolar ve inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan inflamatuvar yanıtın pulmoner fibrozise neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. İnflamasyonun İPF sürecinde kritik olduğunu göstermek için ileri sürülen kanıtlardan biri, pulmoner fibrozisde alveolar alanda inflamatuvar hücrelerin birikimidir. İPF'de nötrofil ve

eoziyofil miktaryının bronşoalveolar lavaj (**BAL**) sıvısında artması inflamasyonun hastalığın patogeneğinde etkili olabileceğini düşündürmüştür (Meltzer ve diğ., 2008). Teoriye göre, eksojen bir uyarıya karşı sürekli yenilenen inflamatuvar yanıtla artan inflamatuvar hücre birikiminin pulmoner fibrozise neden olmaktadır. Hastalığın patolojisinde, interlökin (**IL**)-1 β , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, makrofaj inflamatuvar protein-1 α ve makrofaj koloni stimüle edici faktör gibi pro-inflamatuvar sitokinler etkilidir. Sitokin çeşidi, hastalığın farklı adımlarında baskın olan hücre tipleri hakkında ipuçları vermektedir. IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi yardımcı T-hücresi sitokinlerin İPF'li hastalardan alınan primer hücrelerin kültüründe kontrol hücrelere göre önemli düzeylerde arttığı saptanmıştır (Furuie ve diğ., 1997). Alveolar makrofajlardan salınan IL-10, sağlıklı akciğerlerden alınan T-hücrelerin proliferasyonunu baskılayarak, İPF'li akciğerden elde edilen T-hücrelerini baskılayamaz. Ayrıca, nötrofil, monosit ve lenfosit aktivasyonu ve kemotaksisinde görev alan sitokinlerin İPF'li hastaların akciğer doku ve BAL sıvısında arttığı tespit edilmiştir. Bu sitokinler, makrofaj inflamatuvar protein-1 α , IL-8 ve makrofaj koloni stimüle edici faktördür (Bringardner ve diğ., 2008). Bringardner ve arkadaşları (2008), inflamasyonun bu hastalığın patogeneğindeki rolünü göstermek için 5 potansiyel hipotez önermiştir. Bu hipotezler: direkt inflamasyon hipotezi, matriks hipotezi, büyüme faktör-reseptörü hipotezi, plastisite hipotezi ve vasküler hipotez'dir (**Şekil 2.1**). Direkt inflamasyon hipotezine göre lenfosit, eozinofil, nötrofil, monosit, makrofaj ve plazma hücrelerinden salınan pro-fibrotik sitokinler aracılığıyla direkt olarak fibrozis uyarılmaktadır. Matriks hipotezine göre pro-inflamatuvar ve fibrotik sitokinler ECM elemanlarının üretimini ve interstisyel alanda birikimini artırır. Ayrıca matriks deviniminde etkili olan matriks metalloproteinaz (**MMP**) ve onların inhibitörleri (**TIMP**) arasındaki dengenin bozulması nedeniyle biriken ECM elemanları uzaklaştırılmamaktadır. Bir diğeryer hipotez olan büyüme faktör reseptörü hipotezine göre FGF, insulin benzeri büyüme faktörü (**IGF**), PDGF ve monosit koloni stimüle edici faktör (**M-CSF**) gibi moleküller, parakrin ve otokrin sinyallemeyle özellikle fibroblast/miyofibroblast hücrelerinin çoğalmasını uyarır. Ayrıca çeşitli epitel ve mezenkimal hücrelerden pro-inflamatuvar ve pro-fibrotik moleküllerinin salınmasını da sağlayarak pulmoner fibrozis patogeneğinde rol oynarlar. Plastisite hipotezinde ise AEC'ler, endotel hücreleri, çeşitli kan hücrelerinin fibrotik sinyaller varlığında fibroblast-miyofibroblastlara farklılaştığı savunulmaktadır. Son olarak, vasküler hipotezde, dolaylı olarak vasküler trombus sonucu pıhtılaşma bölgesinde kan hücreleri tarafından inflamatuvar aracılaryn salındığı ve bu aracılaryn interstisyel alanda yer alan çeşitli bağ dokusu hücrelerinden pro-fibrotik moleküllerin salınmasını uyararak fibrozise neden olduğu ileri sürülmektedir.



Şekil 2.1: İnflamasyonun pulmoner fibroziste etkili olduğunu açıklayan 5 hipotezin şekilsel gösterimi. Brindgardner ve diğ. (2008)'den alınmıştır.

İnflamatuvar yanıt etkin bir şekilde tedavi edildiğinde fibrozisin önlenebileceği veya sınırlandırılabilirliği düşünülmüştür. Ancak yapılan deneysel çalışmalarda anti-inflamatuvar tedavilere beklenen yanıtlar elde edilememiştir (ATS ve ERS, 2002; Maher ve diğ., 2007; Meltzer ve diğ., 2008; Raghu ve diğ., 2011). İPF tedavisinde kullanılan immünsupresör ilaçlar, bazı semptomları iyileştirmekte, ancak pulmoner fibrozisi geriletilememektedir.

2.1.2.2. Anormal Yara İyileşmesi Teorisi

İPF'in oluşumuna dair diğer bir alternatif teori, anormal yara iyileşmesi teorisidir. Bu teoriye göre akciğer alveollerinde meydana gelen tekrarlı hasarlar sonucu, hatalı onarım süreci pulmoner fibrozisin oluşumuna neden olmaktadır (Selman ve diğ., 2001). Çeşitli risk faktörlerinden bir veya birden fazlası akut alveolar epitel hasarı meydana getirir. Alveolar epitelde yer alan tip 1 ve tip 2 pnömositler yaralanır. Hasar etmeni alveolar epitelde yeniden epitelizasyon sağlanamadan bazal membranın bozulmasına yol açar. Hasar sonucu epitel hücrelerinden salgılanan interlökin-1 β , IL-8, IL-17 ve monosit kemotaktik faktör ve TNF- α dokuda yer alan fibroblastların aktivasyonunu, göçünü ve proliferasyonunu uyarır (Vaillant ve

diğ., 1996; François ve diğ., 2015). Yara bölgesine gelen fibroblastlar, salgıladıkları sitokinlerle parakrin olarak alveolar epitel apoptozuna yol açar. Daha sonra fibroblastlar aşırı ECM bileşenlerini üreten miyofibroblastlara farklılaşarak fibroblastik odaklar oluşturur. Miyofibroblastlar çoğalır ve daha fazla ECM bileşeni üretir. Bu ürünler interstisyel alanda birikir. Bir yandan yara iyileşmesinin bir diğer adımı olan fibrinolizis aşaması işlerliğini yitirirken, aşırı miktarda sentezlenip alveolar alanda biriken ECM bileşenlerini yıkan MMP'lerin ekspresyonlarının ve aktivasyonlarının azalması nedeniyle, ECM'de biriken matriks elemanları sindirilememektedir. Sonunda akciğerin normal yapısı bozulup, gaz değişim fonksiyonunun sınırlandığı pulmoner fibrozis oluşur (Selman ve diğ., 2001; Selman ve Pardo, 2002). İPF'in histolojik özellikleri hastalığın inflamatuvar bir nedenden kaynaklandığını gösterir, ancak deneysel hayvan modellerinde klinik bulgular ve gen transfer çalışmaları inflamasyondan bağımsız fibrozisin İPF'e neden olabileceğini desteklemektedir. Ancak son çalışmalar akut ve kronik inflamasyonun İPF'e doğrudan neden olmasa da rolü olduğunu göstermektedir. Bu nedenle İPF'de inflamasyonun etkisi göz ardı edilmemelidir (Hunninghake ve diğ., 2003; Bringardner ve diğ., 2008). Sonuç olarak, son yıllardaki yaklaşım İPF'in kompleks bir hastalık olduğu yönündedir. Hastalık patogeneğinde hem inflamasyon hem de anormal yara iyileşmesi süreçleri boyunca çok sayıda sinyal yollağının dahil olduğu olağandışı bir yara iyileşmesi görülmektedir (Gauldie ve diğ., 2002; Strieter, 2002).

2.1.3. Pulmoner Fibrozisde Rol Oynayan Anahtar Hücreler ve Miyofibroblast Havuzuna Katkı Sağlayan Mekanizmalar

2.1.3.1. Pulmoner Fibrozisde Tip 2 Pnömositler ve Epitelial-Mezenkimal Geçiş

Akciğerin alveol epiteli, tip 1 pnömosit ve tip 2 pnömositlerle kaplıdır. Gaz değişim fonksiyonu için özelleşen tip 1 pnömositler, distal hava yollarının, alveolar yüzey alanının %93'ünü kaplar. Alveolar epitelin diğer hücre tipi olan tip 2 pnömositler ise solunum yüzeyinin %7'sini örter. Tip 1 pnömositler, daha geniş bir alanı kaplamalarına rağmen, sayıca tip 2 pnömositlerden daha azdır. Tip 1 pnömositler, alveolar kapillerlerle arasındaki mesafeyi azaltmak için şekillerini yassılaştırmışlardır. Bu durum solunum gazlarının geçeceği mesafeyi kısaltarak, bu hücreler aracılığı ile gaz değişiminin yapılmasına imkân sağlamaktadır. Tip 2 pnömositler ise sıklıkla alveollerin köşelerinde bulunurlar ve bu özelliklerinden dolayı "alveolar gatekeeper (alveol bekçi hücreleri)" olarak adlandırılmaktadırlar. Tip 2 pnömositler, sürfaktan üretirler, depolarlar ve salgırlar; ayrıca alveolar sıvı birikimini azaltır ve doğal bağışıklıkta rol oynayan molekülleri üreterek immün yanıtta da katkı sağlar. Bu görevleri dışında özellikle progenitör bir

hücre olduğu için herhangi bir hasar sonrası epitel onarımına katkı sağlamak için bölünerek tip 1 ve tip 2 pnömositleri verebilir (Fehrenbach, 2001). Bu farklılaşma fonksiyonel alveolar epitelin yeniden kurulumu için önemli bir gerekliliktir (Selman ve diğ., 2006). İPF’de AEC’ler morfolojik olarak anormaldir ve heterojen fenotipler yansıtır (Selman ve Pardo, 2006). İPF’de tip 2 pnömositlerde meydana gelen bu fenotipik değişikliklere yol açan biyokimyasal, genetik ve epigenetik birtakım değişiklikler bilinmesine rağmen, halen belirsizlikler vardır. İPF’de tip 2 pnömositlerin tip 1 pnömositlere fonksiyonel farklılaşmasında kökten bir değişiklik meydana gelmektedir. Bu durumda, tip 2 pnömositler epiteliyal karakterini kaybedip mezenkimal karakter kazanırlar ve miyofibroblastlara farklılaşırlar. Ayrıca, tip 2 pnömositler salgıladıkları TGF- β , PDGF ve TNF- α gibi peptidler ile otokrin ve parakrin yollarla birbirleriyle ve mikro çevredeki farklı tip hücrelerle etkileşirler. Bu etkileşimin bir sonucu olarak fibroblast çoğalması ve aktivasyonu uyarılır. Tip 2 pnömosit ve fibroblastlardan farklılaşan miyofibroblastlar tarafından üretilen ECM bileşenleri interstisiyel alanda birikir (Selman ve diğ., 2006).

Epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT) ilk olarak 1980’lerin başında embriyonik gelişim ve organogeneze dayanak olan bir süreç olarak tanımlandı. Sonraki yıllarda mezoderm ve nöral krest oluşumuna katkı sağladığı gösterildi (Taneyhill ve diğ., 2007; Nakaya ve diğ., 2008). EMT, epitel hücrelerinin epiteliyal fenotiplerini kaybederek fibroblast benzeri özellikleri kazandığı, hücre adezyonunun azaldığı ve hücre hareketliliğinin arttığı bir süreç olarak tariflenmektedir. Hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunun azalması, epitel hücrelerinin hücre-hücre ve hücre-ECM bağlantılarının kopmasına yol açarak, onların pro-fibrotik özelliklerini gösterecekleri yara bölgesine göç etmelerine izin verir. EMT, son on yıldan beri fibrotik hastalıkların potansiyel katkı sağlayıcısı olarak kabul edilmektedir. EMT’nin fibrozise katkısı *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ve klinik verilerle desteklenmektedir. İnsan bronşiyal epitel hücrelerinde, primer AEC’lerde ve akciğerden elde edilen A549 ve BEAS2B hücre hatlarında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar ile akciğer dokusunda EMT uyarımının gerçekleştiği gösterildi (Kasai ve diğ., 2005; Kanemaru ve diğ., 2018). Bu çalışmalar, EMT’ye giden epitel hücrelerinde epiteliyal hücre belirteçlerinin (E-kaderin, sitokeratin ve Zonula okludens) gen ve protein seviyelerinin azaldığını, tersine mezenkimal hücre belirteçlerinin (kollajen I ve III, N-kaderin, fibronektin, vimentin ve S100A4) gen ve protein seviyelerinin arttığını göstermiştir. Aynı zamanda EMT’ye giden hücrelerde miyofibroblast belirteci olan α -SMA seviyelerinde de artış gözlenmektedir (Kasai ve diğ., 2005; Ning ve diğ., 2018).

2.1.3.2. Pulmoner Fibrozisde Fibroblastlar ve Fibroblast-Miyofibroblast Farklılaşması

Fibroblastlar, ECM bileşenlerinin sentezi, yıkımı ve ortadan kaldırılmasında önemli görevler olarak matriks homeostazının korunmasında etkili olurlar. Matriks homeostazının korunması, İPF’de meydana geldiği gibi doku kaybı sonrası normal doku fonksiyonunun korunması için de gereklidir. Fibrozis süreci boyunca fibroblastlar aktifleşerek miyofibroblast fenotipine farklılaşır. Bu fenotip agresif bir fenotiptir. Bu hücrelerin sayısı ve aktivasyonundaki artış ile apoptoza karşı gösterdikleri direnç, fibrotik fenotipin anahtar özelliğidir. Miyofibroblastlar fenotipik olarak fibroblastlar ve düz kas hücreleri arasında yer alan ara hücre tipi özellikleri taşır. Miyofibroblastlar, α -SMA ve aşırı ECM bileşeni sentezleyerek dokuda yeniden modellenmeye yol açarak akciğer fonksiyonunu bozarlar (Thannickal ve diğ., 2003).

İnterstisiyel fibroblast ve miyofibroblastlar artan ECM birikiminden sorumlu anahtar hücrelerdir. Güncel olarak, İPF hastalarının akciğerinde aktive olmuş fibroblast/miyofibroblastların hücrel kaynaklarını açıklayan üç ana teori vardır. Birincisi, interstisiyel alanda yer alan mevcut pulmoner fibroblastların sitokinlere ve büyüme faktörlerine yanıt olarak çoğalıp fibroblast havuzunu arttırmasıdır (Phan, 2012). İkincisi, kemik iliğinden kökenlenen dolaşımdaki fibrositlerin, interstisiyel fibroblastların progenitörleri olarak rol oynayıp fibrotik durumda akciğere göçüp fibroblast havuzuna katkı sağlamasıdır (Philips ve diğ., 2004; Moore-Morris ve diğ., 2014). Üçüncüsü ise son zamanlarda önerilen tip 2 pnömositlerin, EMT aracılığıyla miyofibroblastlara farklılaşmasıdır (Willis ve diğ., 2005; Selman ve diğ., 2006). Ayrıca endotel hücrelerden, lipofibroblastlardan ve dokuya özgü kök hücrelerden fibrojenik miyofibroblast havuzuna katkılar olmaktadır (Kendall ve Feghali-Bostwick, 2014).

2.1.4. Pulmoner Fibrozisde Rol Oynayan Önemli Sinyal Yolakları

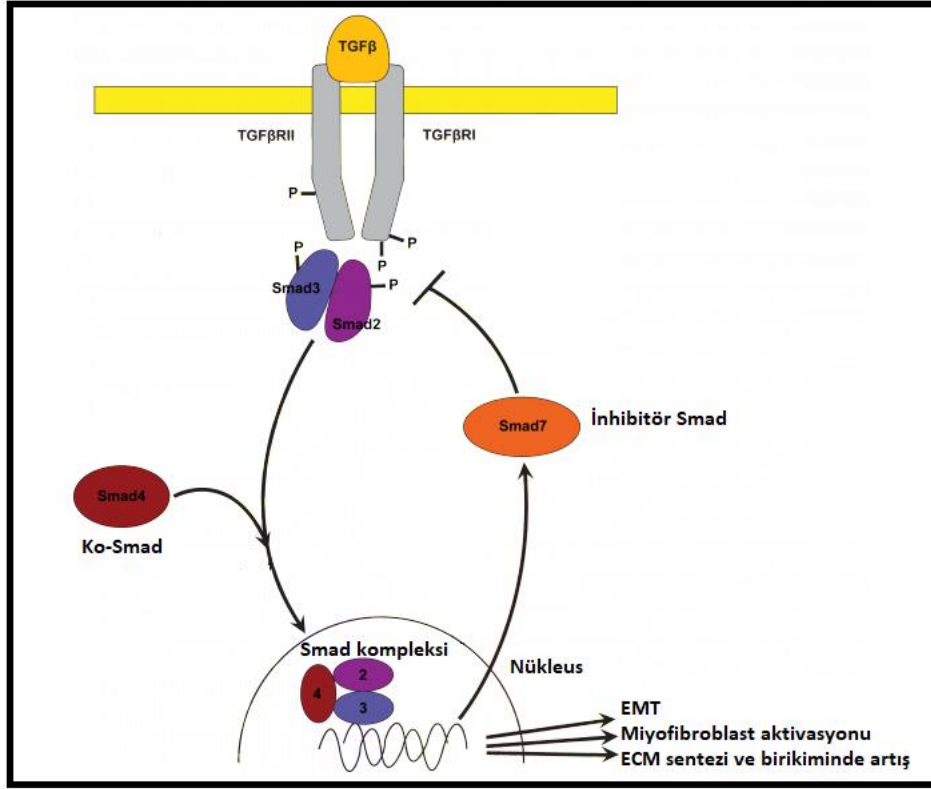
2.1.4.1. TGF- β 1/Smad Sinyal Yolağı

Fibrotik akciğerde çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü bulunmaktadır. Bu moleküllerden özellikle TGF- β 1 fibrozisde kurucu rol üstlenmektedir. Bu çok fonksiyonlu sitokin, ECM oluşumu ve yeniden modellenmesinde anahtar düzenleyicidir (Limper ve diğ., 1991; Coker ve diğ., 2001; Ask ve diğ., 2008). Normal erişkin akciğerinin tersine, İPF’li akciğer dokusunda TGF- β 1 ekspresyonunda artış belirlenmiştir, ancak TGF- β 2 ve TGF- β 3 izoform seviyelerinde önemli fark olmadığı belirtilmiştir (Khalil ve diğ., 1996). TGF- β 1’in etkisini doğrudan ele alan bir araştırmada da adenoviral vektör aracılı gen transferi kullanılarak kemirgen akciğerlerinde

aktif TGF- β 1'in geçici aşırı ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Vektör uygulanmasından sonraki birkaç gün içinde endojen olarak aktif TGF- β 1 ekspresyonu artarken, herhangi bir inflamasyon gerçekleşmeksizin pulmoner fibroziste gözlenen doku remodellenmesi meydana gelmiştir. Üstelik, fibroblastik odak oluşumu indüklenmiş ve miyofibroblast farklılaşması tesbit edilmiştir (Sime ve diğ., 1997). Güncel olarak TGF- β 1 akciğer fibrozisinde EMT'nin ana indükleyicisi olarak gösterilmektedir.

TGF- β süper ailesi, pulmoner fibrozis oluşumunda anahtar sinyallerden birisidir ve çeşitli biyolojik yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan molekülleri içerir. TGF- β süper ailesi içinde, TGF- β 'nin üç izoformu (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), kemik morfogenezik proteinleri (**BMP**'ler), Müller inhibe edici faktör, aktivinler, çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri yer alır (Heldin ve Moustakas, 2016).

TGF- β 1 sinyal yolunda, hücre zarında yerleşen serin/treonin kinaz aktivitesine sahip üç tip TGF- β 1 reseptörü (**T β RI, II, III**) ve hücre dışından gelen sinyalin nükleusa aktarılmasında rol oynayan sitoplazmik TGF- β sinyal yolu molekülleri (Smad proteinleri) görev alır. Bu sinyalleme yolu, Smad bağımlı TGF- β sinyal yolu olarak bilinir. Diğer yandan TGF- β , Smad proteinlerinden bağımsız olarak fosfatidilinositol 3-kinaz (**PI3K**) ve çeşitli mitojenlerle-aktive olan protein kinaz (**MAPK**) molekülleri aracılığı ile de hedef genleri etkileyebilir. Smad proteinleri, görevleri bakımından üç grupta toplanır. Birinci gruptakiler, reseptörlerce aktive edilen Smadlardır (R-Smads); bunlar Smad1, 2, 3, 5 ve 8 olarak adlandırılır. TGF- β ve aktivinler Smad2 ve 3 proteinleri ile BMP, büyüme ve farklılaşma faktörleri ile Müller inhibe edici faktör ise Smad1, 5 ve 8 proteinleri aracılığı ile hedef hücrelerinde sinyallenmeyi gerçekleştirirler. İkinci gruptaki Smadlar, fosforillenerek aktive olan Smad2 ve 3 proteinleri (p (fosfo)-Smad2 ve p-Smad3) ile kompleks oluşturarak onları nükleusa taşır (**Şekil 2.2**). Bu grupta yer alan Smad4 proteini, yaptığı görev nedeniyle co-Smad (complementary, tamamlayıcı Smad) olarak da bilinmektedir. Üçüncü gruptaki Smad proteinleri ise ya Smad4'e bağlanıp kompleks oluşmasını engelleyerek ya da Smad2 ve Smad3'ün fosforilasyonunu engellemek için T β RI'e bağlanarak inhibisyon işlevi yapan inhibitör Smad proteinleridir. Smad6 ve Smad7 birer inhibitör Smad proteinidirler (Hayashi ve diğ., 1997; Imamura ve diğ., 1997).

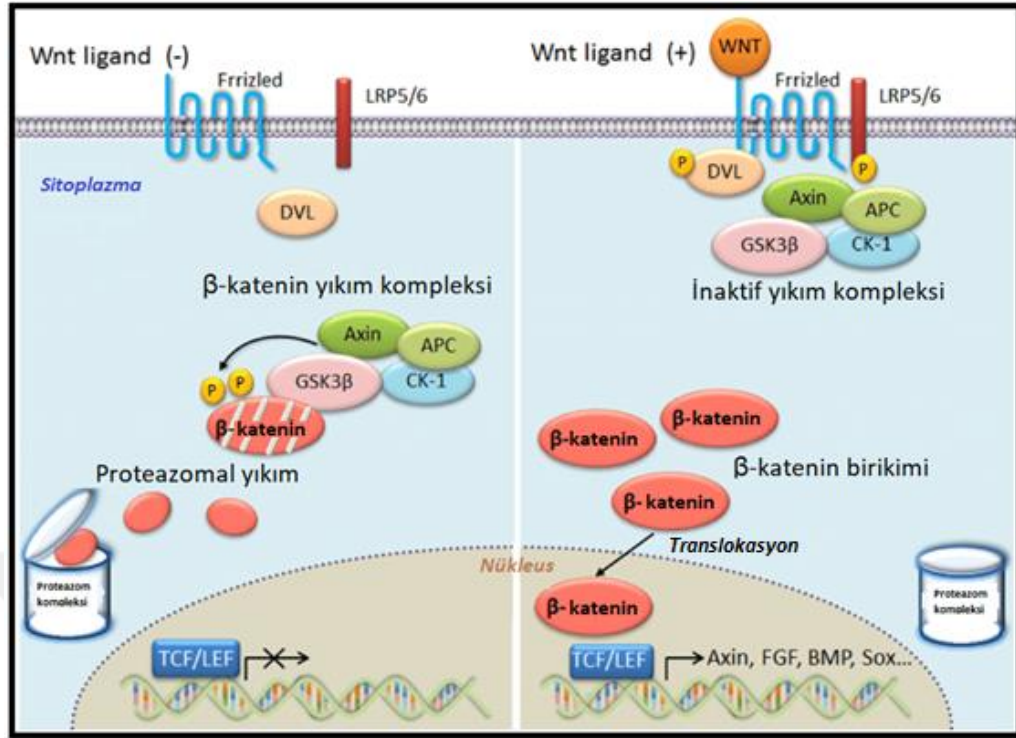


Şekil 2.2: TGF-β/Smad2/3 sinyal yolunun şematize gösterimi. <https://www.pancreapedia.org/pathways/tgfbeta-smad>'den değiştirilmiştir.

TGF-β1, hücrede öncü bir molekül olarak sentez edilir ve proteolitik olarak kesilerek inaktif formda bulunur (latent TGF-β1). Latent TGF-β1, olgun TGF-β1 ve onun amino ucuna kovalent olmayan bağlarla bağlı proteinden (latent TGF-β1 ile ilişkili protein) oluşur. TGF-β1 aktif olmadığı zaman inaktif formda ECM'de depolanır. TGF-β1, reaktif oksijen türleri ve çeşitli proteazlarla aktive edilebilir. Latent TGF-β1 ilişkili proteinin ayrılması ile serbest ve aktif hale gelen TGF-β1, hücre zarındaki TβRII'ye bağlandığında bu reseptörü fosforiller. TβRII reseptörü kinaz aktivitesi kazanarak TβRI ile heterotetramerik yapı oluşturur ve TβRI'ü fosforiller. TβRI'in fosforillenmesi bu reseptörün kinaz aktivitesini uyarır ve Smad2 ve Smad3'ü fosforilleyerek bu proteinleri aktive eder. Aktive olan Smad2 ve/veya Smad3 (p-Smad2, p-Smad3), Smad4 ile birleşerek nükleusa gidip orada birikirler. Burada bazı promotörlerdeki GTCT nükleotid dizilerine (Smad bağlayıcı bölgeler) bağlanarak diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte hedef genlerin transkripsiyonunu düzenlerler (Massague ve diğ., 2005; Bhaskaran ve diğ., 2007). TGF-β, aktivin ve BMP ile sentezi uyarılan Smad7 proteini, TβRI ile birinci grupta yer alan Smad proteinlerinin etkileşimini engelleyerek ya da TGF-β reseptörlerinin yıkımını düzenleyerek TGF-β, aktivin ve BMP sinyal yollarını durdurur.

2.1.4.2. *Wnt Sinyal Yolağı*

Wnt sinyal yolu türler arası yüksek derecede korunmuştur, gelişimsel süreçler için gereklidir ve hastalık patogenezi boyunca baskılanabilir veya yeniden aktive edilebilir. Örneğin Wnt/ β -katenin sinyalleme pulmoner fibrozis sürecine katkı sağlayan önemli bir sinyal yolu olarak karşımıza çıkmaktadır. β -katenin hücreler arasında yer alan hücrelerin birbiriyle sıkı bağlantıda olmasını sağlayan E-kaderin moleküllerinin hücre içi kısımlarına bağlanarak iki hücre arası kurulan etkileşimin devamlılığında önemlidir. Normal bir dokuda herhangi bir dış etken nedeniyle geçici olarak bozulan E-kaderin etkileşimi sonrası E-kaderin- β -katenin etkileşimi de geçici olarak bozulur ve β -katenin sitozolde serbestleşir. Wnt ligandı yokluğunda Wnt reseptör aktivasyonu gerçekleşmeyeceğinden Dishevelled (**DVL**) proteinleri fosforillenmez ve serbestleşen β -katenin, aktif glikojen sentaz kinaz-3 β (**GSK-3 β**), Axin, kazein kinaz-1 (**CK-1**) ve adenomatozis polipozis coli proteini (**APC**)'ni içeren yıkım kompleksi aracılığıyla fosforillenerek proteozomal yıkıma yönlendirilir. Sonrasında β -katenin yıkılacağından hücre içi sinyal oluşturamaz. Wnt ligandı bulunduğu durumda ise ligandlar Frizzled (**FZD**) ve onun ko-reseptörleri olan **LRP5/6**'ya bağlanarak aktifleşir. Aktifleşen FZD reseptörü, DVL proteinlerini aktifleştirerek hücre içi sinyal kaskadını başlatır. Fosforillenen DVL, GSK-3 β 'yı fosforilleyerek inaktive eder ve Axin, CK-1 ve APC'nin de içinde yer aldığı yıkım kompleksini inaktive eder. Böylece aktif olmayan yıkım kompleksi β -katenini fosforilleyemediği için proteolitik yıkıma yönlendiremez ve β -katenin sitozolde birikir ve nukleusa geçerek DNA üzerinde TCF/LEF kompleksleriyle etkileşerek hedef genlerinin ekspresyonunu aktive eder (**Şekil 2.3**; Ota ve diğ., 2016).



Şekil 2.3: Wnt/β-katenin sinyal yolunun şematize gösterimi. Wnt ligand varlığında β-kateninin sitoplazmadaki stabilizasyonu ve Wnt/β-katenin sinyal aktivasyonu uyarılır. Ota ve diğ. (2016)'dan değiştirilmiştir.

2.2. PULMONER NÖROENDOKRİN HÜCRELER

2.2.1. Genel Özellikleri ve Fonksiyonları

PNEC'ler, ilk kez Friedrich Feyrter tarafından 1938 yılında insan ve hayvan akciğer havayolu epitelinde yer alan diffüz epithelial endokrin systemin bir parçası olarak tanımlanmıştır (Feyrter, 1938). Kendisi 1954 yılında yayınladığı bir makalede bu hücreleri gümüş ile boyanabildikleri için arjirofilik sitoplazmalı, tek tek veya küçük kümeler halinde bulunan hücreler olarak tariflemiştir (Feyrter, 1954). Bu hücreler ışık mikroskopunda hava yolu lümenine erişen apikal sitoplazmalı şişe şekilli hücreler şeklinde (açık tip) veya hava yolu bazal membranı boyunca uzamış sitoplazmalı dentritik hücre benzeri lateral oluşumlara sahip hücreler şeklinde (kapalı tip) gözlenmektedir. Fetal akciğerde açık tip PNEC'ler hava yolu lümeninden uyarı alırken, kapalı tip PNEC'ler akciğer gelişimi sürecinde önemli olduğu bilinen fetal nefes alıp verme hareketleriyle ve/veya akciğer sıvı sekresyonuyla oluşturulan mekanik gerilimle uyarılmaktadır (Pan ve diğ., 2006). PNEC'ler çoğunlukla havayolu epitelinin bazalinde silli hücrelerin, goblet hücrelerinin ve pnömositlerin arasında gözlenir. Tek tek bulunan PNEC'ler terminal bronşiyollere kadar trake ve bronş epiteli boyunca dağınık

yerleşirken, PNEC hücre toplulukları olan nöroepitelial cisimcik (**NEB**)'ler distal hava yollarının epitelinde yan yana veya üst üste düzenlenen hücre toplulukları oluştururlar ve hava yolu dallanma bölgelerinde yerleşmişlerdir (Cho ve diğ., 1989; Cutz ve diğ., 2008). PNEC'ler bombesin/GRP, CGRP, kalsitonin, P maddesi, kolesistokinin, somatostatin, endotelin, peptid YY, helodermin ve hipofiz adenil siklaz aktive edici protein gibi çeşitli nöropeptidler üretilen salgırlar. Ürettikleri diğer maddeler arasında serotonin, asetilkolin gibi biyojenik aminler, nöron spesifik enolaz, protein gen ürünü 9.5 ve kalbindin D28K gibi çeşitli nöroendokrin markırlar da bulunmaktadır. Bu spesifik markırlarının bulunması ile PNEC'lerin fetal/neonatal akciğerlerde çok sayıda ve yaygın gözlenmesine karşın, erişkin akciğerlerde sayıca azaldığı tespit edilebilmiştir (Cutz ve diğ., 2008). Ancak, tüm hava yolu epitelinin konfokal mikroskopiden elde edilen görüntülerinin birleştirilip üç boyutlu olarak yeniden yapılandırılmasıyla elde edilen bulgularda, tek tek bulunan PNEC'lerin erişkin akciğerlerin havayollarında homojen olarak dağılmadığı ve belli bölgelerde sayısının arttığı rapor edilmiştir (Weichselbaum ve diğ., 2005; Cutz ve diğ., 2008). PNEC'ler ultrasüktörtürel seviyede incelendiklerinde, amin ve peptidlerin depolanma yerleri olan çok sayıda sitoplazmik küresel vesiküllerin varlığı ile karakterize edilen hücreler olarak ayırt edilmişlerdir. Hava yolu yüzeyine bakan apikal membranları kısa mikrovilluslar içerir. Sitoplazmalarında küçük mitokondriler, düz yüzlü ve granüllü endoplazmik retikulum, ribozomlar, mikrotübüller ve mikrofilament demetlerinden oluşan organeller bulunur. Ayrıca, iyi gelişmiş Golgi kompleksleri, çok sayıda veziküller aracılığıyla yoğun küresel sitoplazmik granüller ile ilişkilidir (Lauweryns ve diğ., 1985). PNEC inervasyonları üzerinde yapılan elektron mikroskopi çalışmaları, bu hücrelerle ilişkili iki tip sinir sonlanmalarının varlığını göstermektedir. Fare ve sıçan akciğerlerinde yapılan çalışmalarda, bazı NEB'lerin motor ve nitrejenik sinir fibrillerinin yanısıra, vagal/jugular ve spinal sensör sinir fibrilleri ile inerve oldukları gözlemlenmiştir. Nitrejenik sinir sonlanmaları intrinsik peribonşiyal gangliyondan gelir (Adriaensen ve diğ., 2003). Hem PNEC'ler hem de NEB'ler sinir sonlanmalarıyla ve kan kapillerleriyle ilişkilidirler. İnervasyon almayan NEB'ler ise mekanik veya diğer kimyasal uyarılardan aldıkları sinyaller doğrultusunda hedefleri üzerinde etkili olurlar.

Son 15-20 yıl boyunca modern moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak PNEC'lerin kompleks fonksiyonel rolleri ortaya çıkarılmıştır. Görevleri arasında fetal akciğer büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesi, neonatal adaptasyonda hava yolu oksijen sensörü olması ve postnatal dönemde hava yolu epiteli yenilenmesinde ve akciğer karsinogenezinde önemli olan

akciğer kök hücre nişi sağlamak bulunmaktadır. PNEC'ler primitif hava yolu epitelinde ilk farklılaşan hücre tipleridir (Cutz ve diğ., 1984; Pan ve diğ., 2002). PNEC'ler ve NEB'ler akciğerin biyolojisinin düzenlenmesinde merkezi sinir sistemiyle birlikte çalışırlar. PNEC'ler ve NEB'ler ürettikleri büyüme faktörü ve mitojenik özellikte biyolojik olarak aktif moleküller ile parakrin mekanizmalar aracılığıyla akciğer morfogenezini etkiler. Çok sayıda deneysel araştırma PNEC'lerin gelişen akciğerde hücre büyümesi ve farklılaşması dışında dallanma morfogenezinde de rol oynadıklarını göstermektedir (Cutz ve diğ., 2008). Utero dönemde fetal kemirgen akciğerinde ve insan/kemirgen akciğer organ kültürlerinde eksojen bombesin/GRP güçlü bir büyüme ve farklılaşma uyarıcısı olarak gösterilmiştir (Sunday ve diğ., 1990). Bombesin benzeri peptidler *in vitro* ve *in vivo*'da iletilen hava yollarında ve primitif alveollerde hem mezenkimal hem de epitelial hücrelerin proliferasyonunu uyarır. Ayrıca bu peptidler dallanma morfogenezini artırmanın yanında alveolar tip 2 hücrelerinin farklılaşmasını da indüklemiştir (King ve diğ., 1995). Ek olarak, bombesinin monoklonal antikolarıyla bloklanması, serumsuz organ kültürlerinde akciğer olgunlaşmasını azaltmıştır (Sunday ve diğ., 1993). Bombesin/GRP peptidlerinin akciğer dokuları üzerindeki bu etkileri hem epitel hücrelerinin hem de mezenkimal hücrelerinin yüzeylerinde yer alan GRP reseptörleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Wang ve diğ., 1996; Emanuel ve diğ., 1999). PNEC ve NEB'lerden salınan aminlerin ve çeşitli biyoaktif peptidlerin lokal ve parakrin etki mekanizmaları fetal hamster akciğeri üzerinde yapılan çalışmalarda araştırılmış ve 3H-timidin ve BrdU etiketlemeleriyle bu peptidlerin hücre proliferasyonu üzerinde etkili olup olmadıkları araştırılmıştır. Bu çalışmalarda NEB'lerin hemen bitişiğindeki epitel hücreleri sürekli BrdU ile etiketlenirken, NEB'lerden uzaklaştıkça bu etiketlenme miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, NEB'lerin hücre proliferasyonunu düzenlediği sonucuna varmışlardır (Hoyt ve diğ., 1991; Verckist ve diğ., 2018). PNEC'lerde sentezlenen ve depolanan amin ve peptidler hipoksi ve mekanik stres uyarılarına yanıt olarak hücrelerden salınmaktadır. İlk olarak intrauterin dönemde çevresel hipoksiye maruziyetin NEB'lerden serotonin salgılanmasını tetiklediği belirlenmiştir. Intrauterin akciğer gelişimi göreceli olarak hipoksik bir çevrede ($pO_2 \sim 20-30$ mmHg) meydana geldiği için PNEC'lerden hipoksi aracılı biyoaktif peptidlerin salınımı akciğer organogenezini düzenleyebileceği düşünülmektedir (Sunday ve Cutz, 2000). PNEC'lerin kesin kökeni bilinmemesine rağmen, kanıtlar gastro-intestinal ve pankreastaki analog endokrin hücreler gibi pluripotent epitel progenitorlerin olduğu ön bağırsak endoderminden geliştiklerini göstermektedir. Putatif PNEC progenitorleri ebriyonik dönemin 16. gününde fetal tavşan akciğerinde tüm primitif havayolu epitelinde forse-1 olarak

isimlendirilen erken nöronal gelişim markırıyla pozitif işaretlenmiştir. Sonraki emriyonik dönemlerde PNEC ve NEB'ler progenitorlerden farklılaşma sürecinde forse-1 pozitifliklerini kaybederek serotonin immunpozitif aktivite göstermişlerdir (Pan ve diğ., 2002). PNEC'lerin kökeninin araştırıldığı çalışmalar sonucunda distal akciğer içindeki PNEC'lerin, diğer akciğer epitel hücrelerinden ayrı olarak geliştikleri ve diğer epitel hücrelerine farklılaşmadıkları belirlenmiştir (Reynolds ve diğ., 2000). Son olarak, kök hücre çalışmalarının ilerlemesiyle birlikte moleküler seviyelerde PNEC hücrelerinin gelişimlerinin farelerde Mash1 ve bu genin insanlardaki homoloğu hASH1 ile Hes1(hairy-enhancer of split) genleriyle yönlendirildiği belirlenmiştir. Fare ve insanlarda ASH1 geninin aktivasyonu PNEC gelişimi için gereklidir. Farelerde Mash1 geni çıkarıldığında akciğerde PNEC'lerin farklılaşmadığı belirlenmiştir (Borges ve diğ., 1997; Ito ve diğ., 2000). İlginç bir şekilde, akciğer morfogenezini Mash1 ekspresyonunun kaybından etkilenmemesine rağmen, bu farelerin doğar doğmaz solunum bozuklukları nedeniyle öldüğü gözlemlenmiştir. Diğer yandan PNEC farklılaşmasının artışı Hes1 knockout farelerde embriyonik dönemim 13. gününde PNEC'lerin erken olgunlaştığı 18. günde de PNEC'lerin hiperplaze oldukları gözlemlenmiştir (Ito ve diğ., 2000). Bu çalışmalar sayesinde Hes1'in bir nörojenik gen supresörü olduğu ve PNEC farklılaşmasını azalttığı, Mash1/hASH1 geninin de PNEC farklılaşmasını uyardığı tespit edilmiştir. Daha ileri çalışmalar PNEC'lerin kaderinin, Notch sinyal yolu aracılığıyla Hes1 ve Mash1/hASH1 genlerinin etkileşimleriyle düzenlendiğini göstermiştir (Ito, 1999).

2.2.2. PNEC'lerden Salınan Nöroendokrin Peptidler ve Fonksiyonları

2.2.2.1. Gastrin Serbesleştirici Peptid

Bombesin, ilk kez *Bombina bombina* kurbağasının derisinde tanımlanmış 14 aminoasitlik bir peptittir (Anastasi ve diğ., 1971). Mc Donald ve arkadaşları, amfibi bombesin antikorları kullanarak 27 aminoasitlik bir memeli bombesin homologunu tanımlamıştır ve bu molekülü GRP olarak adlandırmışlardır (McDonald ve diğ., 1979). GRP'nin akciğerlerde PNEC'lerde üretildiği saptanmıştır (Linnoila, 2006). Ayrıca sinir sonlanmalarında da bulunmaktadır. GRP içeren NEB'ler, gelişen akciğerde çok yaygındır, ancak artan yaşla birlikte sayıları azalmaktadır. GRP ve bombesin, karboksil uçlarında yüksek düzeyde korunmuş yedi amino asitlik bir bölgeyi içerirler. Bu bölge onların reseptörlerine bağlanmasında oldukça önemlidir. *GRP* geninin kromozomal lokasyonu 18q21.32'dir ve bu genden 5 transkript oluşur. En uzun transkripti 848 bp'dir ve bu transkript 3 adet ekzon, 2 adet intron içerir ve 148 amino asitlik

peptid üretir. GRP başlangıç olarak 138–148 amino asitlik üç izoformu içeren prohormon şeklinde sentezlenir. İlk 23 amino asit sinyal peptid dizisini içerirken 24. ve 50. amino asitler arasında kalan 26 aminoasitlik dizi GRP'yi oluşturur. Alternatif kesim ile bazı durumlarda 41. ve 50 aminoasitlerden Nöromedin C'de üretilmektedir. Alternatif kesim ile farklı dizi uzunluklarına sahip 3 isoformu oluşmaktadır. GRP'nin reseptörü olan *GRPR* geninin kromozomal lokasyonu Xp22.2'dir ve bu genden 1 transkript üretilir. Bu transkriptin uzunluğu 1929 bp'dir, 3 adet ekzon, 2 adet intron içermektedir. Bu transkript, 384 amino asitlik 7 geçişli transmembran bir membran proteini üretir. GRP ligandının bu reseptörün ekstrasellüler ligand tanıma bölgesine bağlanmasıyla oluşan sinyal, hücre membranının sitoplazmik yüzeyine bakan domainini uyarır ve bu uyarı G proteini aracılığıyla fosfotidil inositol-kalsiyum ikincil habercilerine aktarılarak hücre içi sinyallenmeyi başlatır (Corjay ve diğ., 1991). GRPR, akciğerde makrofajlarda, CD4+ T-hücrelerinde, pan-T hücrelerinde ve polimorf nükleer lökositlerde (De La Fuente ve diğ., 1991; Meloni ve diğ., 1996) ve peribronşiyal fibroblastlarda (Cullen ve diğ., 2000) ve epitelial ve mezenkimal hücrelerde eksprese edildiği rapor edilmiştir (Wang ve diğ., 1996).

Akciğer gelişimi boyunca ilk farklılaşan epitel hücreleri olan PNEC'lerin, bol miktarda bombesin benzeri peptid içerdikleri belirlenmiş ve bu peptidin insanlar, diğer primatlar, sıçanlar ve farelerde gelişen fetal akciğerin büyümesini ve olgunlaşmasını uyarabileceği ileri sürülmüştür (Sunday ve diğ., 1990, 1993; Stangelberger ve diğ., 2005). Bombesin/GRP, gelişen insan ve tavşan akciğerlerinde havayolları epitelinde ve etrafındaki mezenşim dokusunda belirlenmiştir. Bombesin/GRP sentezinin gelişen havayollarının distalinde en yüksek seviyede olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada GRP reseptörünün çoğalan epitel hücrelerinin hücre zarında yer aldığı tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 1996). Emanuel ve arkadaşları, normal fetal baboon akciğer organ kültüründe, bombesin reseptörlerinin epitel ve mezenkim hücrelerinde yerleştiğini bulmuştur. Bombesin'in, epitel ve mezenkimal hücrelerin çoğalmasını sağlayabileceği, tip II pnömositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik edebileceği ileri sürülmüştür (Emanuel ve diğ., 1999). Bir başka çalışmada postnatal 1 ve 3. günler arasında farelere günde iki kere periton içine verilen bombesin/GRP, alveolarizasyonun yarı yarıya tamamlandığı 14. günde alveolar miyofibroblast çoğalmasını, interstisiyel fibrozisi uyardığı ve alveolar duvar kalınlığını arttırdığı gözlenmiştir (Ashour ve diğ., 2006). Diğer bir çalışmada büyüme hormonu serbestleştirici hormon ve bombesin/ GRP'nin antagonistlerinin PC-3 ve DU-145 insan androjen bağımsız prostat kanser hücre soylarında VEGF, FGF ve epitelial büyüme

faktörü (**EGF**) reseptörlerinin ekspresyonlarını baskıladığı bildirilmiştir (Stangelberger ve diğ., 2005). VEGF, bFGF ve EGF'nin pulmoner fibrozis oluşum sürecinin erken safhaları boyunca proliferatif ve göç edici bir mezenkimal hücre fenotipini uyaran faktörler olduğu bilinmektedir (Arciniegas ve diğ., 2007).

2.2.2.2. *Kalsitonin Geni ile İlişkili Peptid*

CGRP, kalsitonin, adrenomedulin ve amilinin içinde yer aldığı nöropeptid ailesinin bir üyesidir. CGRP, 37 amino asitten oluşur ve CGRP- α ve CGRP- β olarak bilinen iki izoformu vardır. α -CGRP, özellikle sinir sisteminde yaygın olarak (%80<) sentezlenir. CGRP, PNEC'ler ile pulmoner havayolları, kan damarları ve lenfoid dokuyu innerve eden akciğerdeki duysal C sinir fibrillerinde bulunur. CGRP, fare ve sıçan akciğerlerinde genel nöroendokrin hücre belirteci olarak kullanılır. CGRP'nin akciğerdeki hedef hücreleri vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, epitel hücreleri ve fibroblastlardır (Yule ve White 1999; Kawanami ve diğ., 2009). CGRP reseptörleri makrofajlar, B ve T lenfositleri ve antijen sunan hücrelerin içinde yer aldığı çeşitli inflamatuvar hücrelerde de vardır (Umeda ve diğ., 1989; McGillis ve diğ., 1991; Vignery ve diğ., 1991; Bracci-Laudiero ve diğ., 2005). CGRP'nin vazoregülatör, bronş koruyucu ve anti-inflamatuvar etkileri bilinir. Gevşetici bir faktör olarak CGRP ve güçlü bir kasıcı faktör olarak serotonin, havayolu düz kas tonusunu ve dolayısıyla akciğer ventilasyonunu düzenlerler. Ayrıca, epitel hücre büyüme faktörü olarak fonksiyon gösteren CGRP'nin pulmoner epitel hücre onarımında rol oynadığı düşünülmektedir. Bir mitojen olan dietilnitrozaminin hiperoksiye maruz kalan hamsterlere verilmesi, kalsitonin ve bombesin mRNA seviyelerini arttırmanın yanısıra, hamster akciğerinde CGRP içeren PNEC'lerin hiperplazisine de neden olur (Skogvall ve diğ., 1999). CGRP, *in vivo* ve *in vitro*'da insan AEC'lerinin çoğalmasını uyarır. CGRP, A549 hücrelerinin çoğalmasını doza ve zamana bağlı olarak arttırır. CGRP reseptör inhibitörü olan CGRP 8-37'nin kullanımı hücrelerde, CGRP ile uyarılan DNA sentezi artışını azalttığı rapor edilmektedir (Kawanami ve diğ., 2009). *CGRP* geninin kromozomal lokasyonu 11p15.2'dir ve bu genden 6 transkript oluşur. En uzun transkripti 916 bp'dir ve bu transkript 3 kodlanan olmak üzere 5 adet ekzon, 4 adet intron içerir ve 128 amino asitlik bir peptid üretir. CGRP başlangıç olarak 128 amino asitlik prohormon şeklinde sentezlenir. İlk 25 amino asit sinyal peptid dizisini içerirken 26. ve 80. amino asitler ile 125. ve 128. amino asitler propeptid dizileridir. Sinyal peptid ve propeptidlerin kesilmesiyle 83. ve 119. amino asitlerinden CGRP aktif peptidi üretilir. Alternatif kesim ile farklı dizi uzunluklarına sahip 3 isoformu oluşmaktadır. CGRP'nin reseptörü olan *CGRP* (*CALCRL*) geninin kromozomal

lokasyonu 2q32.1'dir ve bu genden 9 transkript üretilir. Bu transkriptlerden 5'i protein kodlar. En uzun transkripti 5223 bp'dir ve bu transkript 12 kodlayan olmak üzere 16 adet ekzonu, 15 adet intronu bulunmaktadır ve 461 amino asitlik 7 geçişli transmembran bir membran proteini üretir. CGRP ligandının bu reseptörün ekstrasellüler ligand tanıma bölgesine bağlanmasıyla oluşan sinyal, hücre membranının sitoplazmik yüzeyine bakan domainini uyarır ve bu uyarı G proteini aracılığıyla adenilat siklazı aktive ederek siklik adenosin monofosfat (cAMP) aracılı hücre içi sinyallenmeyi başlatır (Kusano ve diğ., 2012).

2.2.3. PNEC'lerin Akciğer Hasarı, İnflamasyon ve Pulmoner Fibrozisle İlişkisi

PNEC'ler neonatal akciğere kıyasla erişkin akciğerde sayıca azdır. PNEC'ler normal erişkin akciğerinde tüm hava yolu epitel hücrelerinin yaklaşık %0,4'ü kadar bulunurlar. Bu da 1 cm hava yolu epiteli bazal membranı başına yaklaşık 13 hücre bulunması anlamına gelir. PNEC'lerin sıklığı ve dağılımı çeşitli akciğer hastalıklarında değişmektedir. Kronik bronşit ve emfizemin dahil olduğu kronik inflamasyon ve/veya fibrozisle karakterize olan akciğer patolojilerinde PNEC sayısında artış rapor edilmiştir (Gosney ve diğ., 1989). İnflamatuvar akciğer bozukluğu olan hastaların idrarında ve kanında artan kalsitoninle korale olarak Bombesin/GRP immunreaktif PNEC'lere kıyasla kalsitonin içeren PNEC'ler sayıca artmaktadır (Becker ve diğ., 1981). UIP, NSIP, hipersensitivite pnömonisi ve kollajen vasküler hastalıklı interstisyel pnömonilerin dahil olduğu interstisyel pnömonilerin çeşitli formlarında PNEC'lerin sayılarının değiştiği rapor edilmiştir. UIP ve NSIP'de PNEC sıklığı hemen hemen iki kat artmasına rağmen, PNEC'lerin öncül hücrelerden farklılaşması için gerekli olan Hash1 geninin mRNA ekspresyonu ve PNEC proliferatif aktivesinde farklılık vardır. Bu çalışmada UIP olgularında yüksek Hash1 mRNA ekspresyonu gözlenirken, proliferatif aktivitede (Ki67 pozitif hücreler) düşüş gözlenmiştir. Bu bulgu farelerde yapılan bir çalışmada akciğer epitel hücrelerinin EGF'ye maruziyeti sonrası proliferasyonlarında artışın meydana geldiği koşullarda Hash1'in farelerdeki homoloğu olan Mash1'in ekspresyonunun azalmasıyla doğrulanmıştır (Ito ve diğ., 2003; Linnoila ve diğ., 2006). Pulmoner fibrozisin yanısıra inflamatuvar ve fibrojenik akciğer hastalıklarının diğer formlarında PNEC'lerin sıklığı, dağılımı ve bu hücrelerde meydana gelen moleküler değişimlerinin önemi ve mekanizması halen bilinmemektedir. Ancak interstisyel akciğer hastalıklarında PNEC sayısının artışı pulmoner fibroziste PNEC'lere ve onlardan salgılanan moleküllerin fibrotik sinyal yollarına etkilerine bizi odaklamaktadır.

MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.1.1. A549 Hücre Hattı

İnsan A549 hücreleri (ATCC CCL-185), %10 fetal sığır serumu (**FBS**) (Gibco), glutamax (L-Glutamin) ve %1 penisilin/streptomisin karışımı (Gibco) içeren Dulbeco'nun modifiye edilmiş medyumunu ve Ham'ın F12 (**DMEM/F12**) medyumunda (Gibco) %5 karbon dioksit (**CO₂**), %95-100 nem içeren ortamda 37°C'de doku kültür kaplarında büyütüldü. Hücreler kültür kabının yüzey alanının %80-90'ını kapladığında pasajlandı. Pasajlama sırasında, hücreler Dulbeco'nun modifiye edilmiş fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (**DPBS**, 1X, Gibco) ile yıkandı ve 3 ml tripsin/etilendiamin tetraasetik asit (**EDTA**) (Gibco) çözeltisinde 3 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra kültür kabına 7 ml DMEM/F12 medyumunu eklendi. Hücreler, medyumla 1:5 oranında seyreltilerek yeni bir doku kültür kabına transfer edildi. Çalışmamızda kültür kabından 6 kuyucuklu kültür kabına A549 hücreleri aktarıldı ve 24 saat 37°C, %5CO₂ inkübatörde inkübe edildiler. Peptid uygulamaları yapılmadan önce hücreler serum azaltılmış medyumda 24 saat tutuldular. Bu sürenin sonunda hücreler fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (**PBS**, 0,01M; pH 7.2)'de hazırlanan farklı konsantrasyonlarda GRP (10⁻⁵, 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ M, Sigma), CGRP (10⁻⁶, 10⁻⁷ ve 10⁻⁸ M, Sigma) ve 5ng /ml TGF-β (Sigma) ile uyarıldılar. Uyarımı takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde toplanan hücreler canlılık ve hücre proliferasyon testleri ile Western emdirim analizi için kullanıldılar.

3.1.2. MRC5 Hücre Hattı

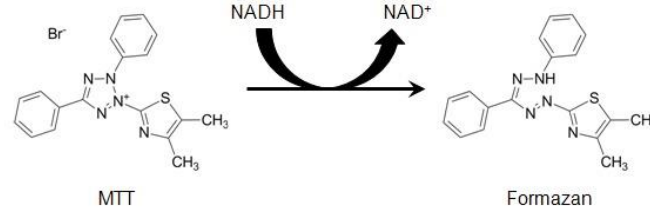
İnsan normal fetal akciğer fibroblast hücreleri (MRC5'ler) (ATCC CCL-171), %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin karışımı (Gibco) içeren Ham'ın F12 (Ham's/F12) medyumunu (Gibco)'nda %5 CO₂, %95-100 nem içeren ortamda 37°C'de doku kültür kabında büyütüldü. Hücre hattı kültür kabının yüzey alanının %80-90'ını kapladığında pasajlandı. Pasajlama sırasında, hücreler 1x PBS ile yıkandı ve 3 ml tripsin/EDTA (Gibco) çözeltisinde 3 dakika 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, kültür kabına 7 ml Ham's/F12 medyumunu eklendi. Hücreler, medyumla 1:5 oranında seyreltilerek yeni bir doku kültür kabına transfer edildi. Çalışmamızda 6 kuyucuklu kültür kabına MRC5 hücreleri ekildi ve 24 saat 37°C, %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildiler. Peptid uygulamaları yapılmadan önce hücreler serum azaltılmış medyumda 24 saat tutuldular. Bu sürenin sonunda hücreler PBS'de hazırlanan farklı konsantrasyonlarda

GRP (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M, Sigma), CGRP (10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} M, Sigma) ve 5ng /ml TGF- β (Sigma) ile uyarıldılar. Uyarımı takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde toplanan hücreler canlılık ve hücre proliferasyon testleri ile Western emdirim, gen ekspresyon ve immunfloresan analizleri için kullanıldılar.

3.2. HÜCRE CANLILIK TESTİ

Sitotoksik etki ve metabolik aktivitenin belirlenmesi için yapılan 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi canlı hücrelerden tetrazolium tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan radyoaktif olmayan, kolorimetrik bir testtir. Testin prensibi, tetrazolium tuzlarının hücresel enzimler (mitokondriyal dehidrojenazlar) tarafından renkli formazan tuzlarına dönüştürülmesidir (Şekil 3.1). Kültürde metabolik olarak aktif halde bulunan canlı hücrelerin miktarı ile doğru orantılı olarak formazan kristali içeren hücre miktarında artış olmaktadır ve bu canlı hücreler spektrofotometrik yöntemler ile ölçülmektedir (Marshall ve diğ., 1995). Hücre canlılığı analizi için 0,22 μ m por çaplı filtrelerden geçirilmiş %10 FBS, L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 medyumunu içinde A549 hücreleri ve %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren Ham's/F12 medyumunu içinde MRC5 hücreleri %5 CO₂'de 37°C'lik inkübatörde 24 saat tutulduktan sonra, hücreler %80 oranında kültür kabı tabanını kapladığında medyum uzaklaştırıldı. Hücreler 5 ml ılık DPBS ile yıkandı ve üzerlerine 2 ml tripsin/EDTA eklenerek %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde 3dk inkübe edildiler. Tripsinizasyon sonrasında kültür kaplarından alınan hücreler sayıldı. A549 ve MRC5 hücreleri MTT testi için 10.000 hücre/100 μ l/kuyucuk olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu pleytlere ekildi. Bu hücreler için toksik olmayan GRP ve CGRP peptid dozlarını bulmak amacıyla, hücre ekiminden 24 saat sonra PBS'de çözündürülmüş olan GRP (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M), CGRP (10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} M), 5 ng/ml TGF- β büyüme medyumunu içinde hazırlanarak hücreler üzerine uygulandı. Hücreler uyarımı takip eden 24. 48. ve 72. saatlerde toplandı. Bu hücrelerin ve 0. saatteki (kontrol) hücrelerin üzerine önceden hazırlanmış 30 μ l MTT karanlıkta uygulandı ve 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe hücreler inkübe edildi. Bu sürenin sonunda tüm sıvı içeriği kuyucuklardan çekildi ve her kuyucuğa 100 μ l dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. Pleytler, karıştırıcıda 270 rpm'de 2 dakika çalkalandı. Daha sonra her bir kuyucuğun absorbanansı mikroyuca (µQuant, Biotek) 570 nm dalga boyunda ölçüldü.

MTT hazırlanması: Thiazolyl blue tetrazolum bromid (Sigma) maddesinden 50 mg tartıldı ve madde 10 ml Ca^{++} ve Mg^{++} içermeyen PBS'te çözündürüldü. Bu işlemten sonra çözelti filtre edilip küçük hacimlerde -20°C 'de saklandı.



Şekil 3.1: MTT kimyasal yapısı ve formazan kristallerine dönüşüm reaksiyonu.

3.3. HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ

Hücre proliferasyonu genomik DNA'nın replikasyonu ile belirlenebilmektedir. 5-bromo-2'-deoksüridin (**BrdU**), timidin'in sentetik bir nükleozid analogudur. BrdU, DNA sentezi sırasında timidin molekülünün yerini alarak DNA zincirinin yapısına girebilir. Bölünmeye giden hücrelerin S fazında DNA iki katına çıkmaktadır ve BrdU, çoğalan hücrelerin DNA'sında timidinin yerine geçer. Yöntemin prensibi, sadece S fazındaki hücrelerin BrdU ile etiketlenmesi ve etiketlenen hücre topluluğunun hücre siklusunda ilerlemesinin izlenmesine dayanır. Radyoaktif olmayan BrdU'nun S fazında hücrelerin DNA'sına bağlanmasını takiben anti-BrdU antikollarının kullanımıyla S fazındaki hücre yoğunluğu kolorimetrik olarak analiz edilir (Muir ve diğ., 1990).

Hücrelerin proliferasyon testi için BrdU hücre proliferasyon kiti (Millipore) kullanıldı. Protokol üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Çalışmamızda, BrdU analizi için 0,22 μm por çaplı filtrelerden geçirilmiş %10 FBS, L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 medyumunu içinde A549 hücreleri ve %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren Ham's/F12 medyumunu içinde MRC5 hücreleri %5 CO_2 'de 37°C 'lik inkübatörde 24 saat kültüre edildiler. Daha sonra hücreler %80 oranında kültür kabı tabanını kapladığında ortamdaki medyum uzaklaştırıldı. Hücreler, 5 ml ılık DPBS ile yıkandı ve üzerlerine 2 ml tripsin/EDTA eklenerek %5 CO_2 içeren 37°C 'de inkübatörde 3 dk inkübe edildiler. Tripsinizasyon sonrasında kültür kaplarından toplanan hücreler sayıldı. BrdU testi için 10.000 hücre /100 μl /kuyucuk olacak şekilde A549 ve MRC5 hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Bu hücreler

üzerinde GRP ve CGRP peptidlerinin proliferatif etkilerini belirlemek amacıyla, hücre ekiminden 24 saat sonra PBS’de çözündürülmüş olan GRP (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M), CGRP (10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} M), 5 ng/ml TGF- β büyüme medyumunu içinde hazırlanarak hücreler üzerine uygulandılar. Hücrelere uygulanan peptid inkübasyon sürelerinin bitiminden minimum 2 saat önce her bir kuyucuğa 20 μ l BrdU ilave edildi. Hücreler uyarımı takip eden 24. 48. ve 72. saatlerde toplandılar. Bu sürelerin sonlarındaki ve 0. saatteki (kontrol) hücrelerin yer aldığı kuyucuklardaki sıvılar uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa hücreleri fikse etmek ve DNA’yi denatüre etmek amacıyla 200 μ l fiksasyon solüsyonu ilave edildi ve hücreler karanlıkta oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve 96 kuyucuklu kültür kapları 50°C’de inkübatörde 30 dk inkübe edilerek fiksasyon solüsyonu uçuruldu. Bu sürenin sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyucuğa kitin belirlediği hacim ve konsantrasyonda anti-BrdU antikorunu ilave edildi ve kültür kabı 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kuyucuklar yıkandı ve her bir kuyucuğa TMP peroksidaz konjuge sekonder antikor ilave edildi ve kültür kabı 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyucuklar yıkandı ve kurutulduktan sonra her bir kuyucuğa uygun konsantrasyonda substrat ilave edildi ve kültür kapları 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildiler. Daha sonra kuyucuklar üzerine uygun hacimde reaksiyon durdurucu solüsyon eklenerek kültür kaplarındaki her bir kuyucuğun absorbanansı mikroplyet okuyucuda (μ Quant, Biotek) 450/550 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.4. WESTERN EMDİRİM YÖNTEMİ

3.4.1. Total Protein İzolasyonu

A549 (4×10^5 /kuyu) ve MRC5 ($2,5 \times 10^5$ /kuyu) hücreleri 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini doldurduktan sonra eski medyum uzaklaştırılıp yerine serum azaltılmış medyum eklendi ve hücreler 24 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda serumu azaltılmış medyum uzaklaştırılıp, serumu azaltılmış medyum içinde hazırlanan peptidler hücreler üzerine eklendi. PBS’de hazırlanan 10^{-5} M GRP (Sigma), 10^{-6} M CGRP (Sigma) ve 5 ng/ml TGF- β (Sigma) ile hücreler uyarıldılar. Uyarımı takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra kültür kabının her bir kuyusuna 100 μ l proteaz (Sigma) ve fosfataz inhibitörü (Roche) içeren soğuk RIPA (SantaCruz) lizis tamponu eklendi ve bir kazıyıcı ile kazınarak hücre lizatları toplandı. Lizatlar 1,5 ml’lik steril deney tüplerine transfer edildiler ve buza alındılar. Daha sonra lizat içeren tüpler homojenizasyon verimini arttırmak

için 10 defa 10 saniye ultrasonikatörde (Bandelin) homojenize edildiler. Homojenatlar buzda 30 dakika tutulduktan sonra 15,000 xg'de 15 dakika santrifüj edildiler. Süpernatantlar -20°C'de saklandılar.

3.4.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktar Tayini

Elde edilen süpernatantlardaki total protein miktarı Bradford yöntemine göre belirlendi (Bradford, 1976).

Protein miktar tayin testlerinden biri olan bu testin prensibi proteinlerin yapısında yer alan arjinin gibi bazik ve bazı aromatik amino asitlerin Comassie Brilliant Blue G-250 boyasıyla reaksiyona girerek asidik koşullarda kırmızı renkli olan boyanın mavi renge dönüşümü prensibine dayanır. Reaksiyon sonucu oluşan mavi renkli bileşen mikroyok okuyucuda 595 nm dalga boyunda maksimum absorbanans verir.

Bradford çözeltisinin hazırlanışı: 25 mg Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), 12,5 ml %95 etanolde (Merck) çözündürüldü, 25 ml %85 fosforik asit (H₃PO₄, Sigma) eklendikten sonra hazırlanan boya çözeltisi filtre kâğıdı ile süzüldü ve +4°C'de saklandı.

Protein standart çözeltilerinin hazırlanışı: 1,46 mg/ml sığır serum albümin (BSA, Sigma)'den 80, 40, 20, 10 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Örnekler 1:100 oranında ultra saf su ile sulandırılıp her bir örnek ve standartın 160 µl'si 96 kuyucuklu pleytlere eklendi. Her bir örnek ve standart üzerine 40 µl Bradford çözeltisi koyuldu ve kuyular içindeki karışım pipetle kabarcık oluşturmayacak şekilde karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra mikroyok okuyucuda (µQuant, Biotek)'da 595 nm dalga boyunda absorbanans değerleri ölçüldü. Standart grafik kullanılarak protein miktarları hesaplandı.

3.4.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması, Jele Yüklenmesi ve Elektroforezi

Denatüre jel elektroforezi, proteinleri molekül ağırlıklarına göre ayırmak için kullanıldı. %10'luk ayırma jeli (pH 8.8), 0,75 mm aralıklı iki cam arasına döküldü ve polimerize olması beklendi. Sonra alt jel üzerine %5'lik üst jel (pH 6.8) ilave edildi ve kuyucuk oluşması için üst jele tarak yerleştirildi ve üst jelin polimerize olması beklendi. Jele protein örnekleri yüklenmeden önce 40 µg protein içeren her bir örnek uygun miktarda β-merkaptolanol (AppliChem) içeren 1x Laemli tamponuyla karıştırıldı ve 70°C'ye getirilmiş kuru blokta 10 dakika denatüre edildi ve sonra buza alınarak her bir örnek kuyucuklarına yüklendi (Tablo 3.1).

Elektroforez mini protean tetracell (Bio-Rad) dikey elektroforez sisteminde 70V'ta 30 dk, 100V'ta 45 dk, 120V'ta 60 dk şeklinde yürütüldü. Protein bandlarının moleküler ağırlıklarına göre yerlerinin tespit edilebilmesi için geniş aralıklı renkli ve kemilüminesan özellikli iki ayrı protein standartı kullanıldı.

Tablo 3.1: SDS-PAGE jellerin hazırlanışı (2 jel için).

Solüsyonlar	%10 Ayırma Jeli (ml)	%5 Yükleme Jeli (ml)
%30 Akrilamid-Bis Akrilamid karışımı (Biorad)	3,3	0,67
Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8.8, Sigma)	2,5	-
Yükleme Jeli Tamponu (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8, Sigma)	-	0,5
%10 SDS (Sigma)	0,1	0,04
%10 Amonyum persülfat (Amresco)	0,1	0,04
Temed (N, N, N', N' Tetra etilen metilendiamin, Sigma)	0,012	0,006
Distile Su	4	2,7
Son Hacim	10	4

3.4.4. Proteinlerin Jelden Membrana Transferi (Western Emdirim)

Western emdirim tekniği, proteinleri tespit metodlarından biridir. Jel içerisindeki tüm proteinlerin bir membran üzerine aktarılarak spesifik bir antikor yardımıyla örneğimizdeki spesifik proteinin tespitine ve miktarının optik yoğunluklarına göre kıyaslanmasına olanak veren bir yöntemdir. SDS-PAGE jelde moleköl ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, Transblot yarı ıslak aktarım sistemi (Bio-Rad) ile 25V, 2,5 A'de 7 dk 1x aktarım tamponunda ıslatılmış nitroselölöz membran (SantaCruz) üzerine aktarıldı.

3.4.5. Özgün Protein Bandlarının İşaretlenmesi, Görüntülenmesi ve Analizi

Protein aktarım etkinliğinin kontrolü için membran Ponceu S (Sigma) boyasıyla 15 dk boyandı. Daha sonra membrandan boya çıkarıldı ve membran, spesifik olmayan antijen antikor etkileşimlerinin önüne geçmek için Tween 20 (Sigma) içeren trisle tamponlanmış tuz solüsyonu (**TBST**) içinde hazırlanan %5 yağsız süt tozu (Intron Bio) ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandı. Daha sonra membranlar **Tablo 3.2**'de yer alan primer antikorlarla 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membran 3 defa TBST ile yıkandı ve 1 saat oda sıcaklığında uygun yabanturbu peroksidazı (**HRP**)-konjuge sekonder antikorlarla inkübe edildi. Daha sonra membran 3 defa 30 dakika kadar yıkandı. En son yıkamadan sonra membranlar trisle tamponlanmış tuz solüsyonu (**TBS**) solüsyonuyla 5 dakika yıkandı. Membran üzerine, kemilüminesans substrat uygulanarak membrandaki spesifik proteinlerin oluşturduğu bandlar, Kodak GL1500 Gel Logic görüntüleme sistemiyle görüntülenerek Carestream MI analiz programıyla densitometrik analizleri yapıldı. Protein örneklerine ait band yoğunlukları endojen kontrol olarak kullanılan GAPDH proteinin yoğunluğuna normalize edilerek deney şartları arasında protein miktarlarındaki değişimler belirlendi.

Tablo 3.2: Western emdirim için kullanılan primer antikorlar ve sulandırma oranları.

Antikor	Elde edildiği tür	Dilüsyon	Marka	Molekül Ağırlıkları
α-SMA	<i>Tavşan</i>	1: 500	Novus	42kDa
Fibronektin	<i>Fare</i>	1:500	SantaCruz	220kDa
E-kaderin	<i>Fare</i>	1: 500	SantaCruz	120kDa
Smad 2/3	<i>Tavşan</i>	1: 200	SantaCruz	52-60kDa
p-Smad 2/3	<i>Tavşan</i>	1: 200	SantaCruz	52-60kDa
Smad 4	<i>Tavşan</i>	1: 500	SantaCruz	61kDa
Smad 7	<i>Tavşan</i>	1: 500	Abcam	46kDa
Total β-katenin	<i>Tavşan</i>	1: 500	SantaCruz	95kDa
Aktif β-katenin	<i>Fare</i>	1: 500	Millipore	92kDa
Dkk1	<i>Tavşan</i>	1: 500	SantaCruz	35kDa
Wnt4	<i>Tavşan</i>	1: 500	SantaCruz	40kDa
Wnt5a	<i>Tavşan</i>	1:500	Novus	55kDa
Wnt7a	<i>Tavşan</i>	1:500	Abcam	41kDa
GAPDH	<i>Tavşan</i>	1:500	SantaCruz	37kDa
Anti-tavşan IgG	<i>Keçi</i>	1: 5000	Abcam	-
Anti-fare IgG	<i>Keçi</i>	1: 5000	Abcam	-

3.5. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

3.5.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu, 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş olan MRC5 ($2,5 \times 10^5$ /kuyu) hücrelerinden PureLink RNA Mini Kit (Life Technology) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5.2. RNA Miktarının Ölçülmesi ve Kalitesinin Belirlenmesi

Hücrelerden elde edilen total RNA miktarlarının belirlenmesinde NanoDrop® (Thermo) spektrofotometre kullanıldı. RNA konsantrasyonu A260 nm absorbans ölçümü ile saptandı. A260/280 oranı 1,8-2,1 aralığındaki saf RNA örnekleri tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için kullanıldı. Konsantrasyonu ayarlanan ve saflığı belirlenen RNA örnekleri, Ters Transkriptaz (RT)-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nda kullanıldı.

Örneklerdeki RNA miktarı belirlendikten sonra %1'lik Agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür (Sigma) yardımıyla RNA kalitesi belirlendi. Jelde bütünlüğünü korumuş 28S ve 18S rRNA'ları içeren RNA örnekleri kaliteli olarak nitelendirildi. Bütünlüğünü koruyan RNA'lar cDNA eldesi için kullanıldı. RNA örnekleri kullanılacağı güne kadar -86°C 'de saklandı.

3.5.3. cDNA Eldesi ve Kalitesinin Belirlenmesi

RT-PCR, bir çeşit ters transkriptaz enzimi (MuLV, fare lösemi virüsü transkriptazı) ile yürütülen, kalıp olarak mRNA'nın kullanılıp cDNA'nın oluşturulduğu enzimatik bir reaksiyondur.

Hücrelerden elde edilen RNA, RT-PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere aşağıdaki tablolarda yer alan protokole göre cDNA haline getirildi. RNA'nın cDNA'ya çevrilmesinde kullanılan 20 µl'lik kalıp RNA karışımı **Tablo 3.3**'deki gibi hazırlandı. Bu karışım 200 µl'lik reaksiyon tüplerine aktarıldı ve 15 dk süreyle 70°C 'de inkübe edildikten sonra tüpler zaman geçirilmeden buza aktarılarak 1 dk süreyle buzda bekletildi. Daha sonra 10 saniye süreyle spin yapıldıktan sonra tüpler tekrar buza alındı. Bu karışıma ters transkriptaz karışımı ilave edildi (**Tablo 3.4**).

Ters transkriptaz karışımının da ilave edilmesinden sonra 40 µl son hacimli cDNA reaksiyon tüpleri hazır hale getirildi. Tüpler nazikçe karıştırıldıktan sonra 20°C 'de 10 dk; 43°C 'de 75 dk; 99°C 'de 5 dk'ya programlanmış ters transkriptaz programıyla PCR cihazında inkübe edildi. cDNA kalıplarının eldesinin kontrolü ise %1'lik Agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür

(Sigma) ile boyanarak gerçekleştirildi. Jellerde tipik smear görünümü gözlenen örneklerin cDNA sentezi başarılı olarak kabul edildi. cDNA kalıpları bir süre +4°C’de bırakıldıktan sonra kantitatif gerçek zamanlı (QRT)-PCR yapıncaya kadar –20°C’de saklandı.

Tablo 3.3: Bir reaksiyon kalıp RNA karışımı hazırlaması.

İçerik	Hacim
Template RNA (1000 ng)	Uygun miktar
dH ₂ O	20 µl’ye tamamlanır.

Tablo 3.4: Bir reaksiyon ters transkriptaz karışımı hazırlanması.

Ters Trankriptaz Karışımı (1 reaksiyon için)	
İçerik	Hacim
10X RT-PCR Tamponu II (Applied Biosystems, 100mM)	4 µl
MgCl ₂ (Applied Biosystem)	8 µl
Deoksiniükleotid karışımı (Applied Biosystems, herbiri 10mM)	2 µl
RNaz inhibitör (Applied Biosystems, 20U/µl)	1 µl
Random Hexamer Primer (Applied Biosystems, 50U/µl)	2 µl
Su (PCR için)	1 µl
Ters Transkriptaz (Applied Biosystems, 50U/µl)	2 µl
Son Hacim	20 µl

3.5.4. QRT-PCR ile Gen Ekspresyon Analizleri

QRT-PCR, spesifik DNA fragmanlarının eş zamanlı amplifikasyonuna ve miktarının hesaplanmasına izin veren konvansiyonel PCR çeşididir. QRT-PCR reaksiyon karışımı PCR

reaksiyonu boyunca yeni sentezlenen çift zincirli DNA olukları arasına giren floresan bir boya (Syber Green) içerir ve PCR boyunca artan floresan yoğunluğu her bir döngü sonrası saptanır. Floresan seviyesi, miktarı artan DNA'nın miktarıyla doğru orantılıdır. PCR reaksiyon, Power SyberGreen Master mix (Applied Biosystem) kullanılarak Applied Biosystems'in StepOne Plus cihazında gerçekleştirildi.

ACTA2, *VIM*, *COL1A1*, *TGFB1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD7*, *CTNNB1*, *LEF1*, *AXIN1*, *GSK3B*, *DKK1*, *GRP*, *GRPR*, *CALCA*, *CALCB*, *CALCRL*, *CREB1*, *PKCD*, *PKCZ*, *PKA* ve *HPRT* genlerinin gen ekspresyonunun özgül amplifikasyonu için kullanılan özgül oligonükleotidlerin tasarımı için literatürden ve çeşitli firmalardan yararlanılarak etkinliği tespit edilmiş primerler BLAST programı kullanılarak Tm ve olası primer dimer olasılıkları için kontrol edildi. Bu primerler 5'-3' doğrultusunda aşağıdaki şekilde tasarlanmıştır (**Tablo 3.5**).

Tablo 3.5: İnsan MRC5 hücre hatları için kullanılan primer dizileri.

Gen İsmi	Gen dizisi (5'→3')	
<i>ACTA2</i>	<i>Forward</i>	CGAGATCTCACTGACTACCTCATGA
	<i>Reverse</i>	AGAGCTACATAACACAGTTTC TCCTTGA
<i>VIM</i>	<i>Forward</i>	GGACCAGCTAACCAACGACA
	<i>Reverse</i>	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG
<i>COL1A1</i>	<i>Forward</i>	CAAGAGGAAGGCCAAGTCGAG
	<i>Reverse</i>	TTGTCGCAGACGCAGATCC
<i>TGFB1</i>	<i>Forward</i>	CGTGCTAATGGTGGAAACCC
	<i>Reverse</i>	GGTAGTGAACCCGTTGATGT
<i>SMAD2</i>	<i>Forward</i>	CCAGGTCTCTTGATGGTCGT
	<i>Reverse</i>	TGGAGGCCAAAACCTGGTGTCT

Tablo 3.5 (Devamı): İnsan MRC5 hücre hatları için kullanılan primer dizileri.

Gen İsmi	Gen dizisi (5'→3')	
<i>SMAD3</i>	<i>Forward</i>	GCATGGACGCAGGTTCTCC
	<i>Reverse</i>	GGCTCGCAGTAGGTAAGTGG
<i>SMAD4</i>	<i>Forward</i>	GGAGGTGGCCTGATCTTCAC
	<i>Reverse</i>	CTTGGTGGATGCTGGATGGT
<i>SMAD7</i>	<i>Forward</i>	CGGAAGTCAAGAGGCTGTGT
	<i>Reverse</i>	TGGACAGTCTGCAGTTGGTT
<i>CREB1</i>	<i>Forward</i>	GCCACATTAGCCCAGGTATCTATG
	<i>Reverse</i>	AGTTACGGTGGGAGCAGATGAT
<i>CTNNB1</i>	<i>Forward</i>	AAGTGGGTGGTATAGAGGCTCTTG
	<i>Reverse</i>	GATGGCAGGCTCAGTGATGTC
<i>DKK1</i>	<i>Forward</i>	GCACCCAGGCTCTGCAGTCA
	<i>Reverse</i>	GCACGGGTACGGCTGGTAGT
<i>GSK3B</i>	<i>Forward</i>	CTCATGCTCGGATTCAAGCA
	<i>Reverse</i>	GGTCTGTCCACGGTCTCCAGTA
<i>LEF1</i>	<i>Forward</i>	CATCAGGTACAGGTCCAAGAATGA
	<i>Reverse</i>	GTCGCTGCCTTGGCTTTG
<i>AXIN</i>	<i>Forward</i>	GAAGCGCGTGCGCATGGAGGA
	<i>Reverse</i>	GGCGGGAGGCAGCTTGTGAC

Tablo 3.5 (Devamı): İnsan MRC5 hücre hatları için kullanılan primer dizileri.

Gen İsmi	Gen dizisi (5'→3')	
GRP	<i>Forward</i>	AGGTTCAAAAGGCAAAGGTTCT
	<i>Reverse</i>	GCAGAACGCAGTCTCTTAGG
GRPR	<i>Forward</i>	TGGCTAGACAGGAACCCTTG
	<i>Reverse</i>	CCTACACCACTCAGGAGCAT
CALCA	<i>Forward</i>	TCCTGGCTCAGAGAGGTGTCAT
	<i>Reverse</i>	CTGCAACAGGACCAAGATGCT
CALCB	<i>Forward</i>	TGACTCCAGGAAGAAGGTTATCAT
	<i>Reverse</i>	GGGGCATTCTCACCAAGTTC
CALCRL	<i>Forward</i>	AGAGCTGGACTGGGTCTTGA
	<i>Reverse</i>	AATGCACAATTGTCTCCAGTCT
PKA	<i>Forward</i>	CATTGACCAGCAGGGCTACA
	<i>Reverse</i>	AATCTCAGGGGCCAGGTACT
PKC zeta	<i>Forward</i>	GGCCACAGACTGGATTTTCT
	<i>Reverse</i>	CTCGCTGGTGAAGTGTGTGT
PKC delta	<i>Forward</i>	CCGTTTCTCCTGGTGGTTGG
	<i>Reverse</i>	ATCTTCACGGCACAGAAGGG
HPRT	<i>Forward</i>	AAGGACCCACGAAGTGTTG
	<i>Reverse</i>	GGCTTTGTATTTTGCTTTTCCA

20 µl standart reaksiyon için StepOnePlus (Applied Biosystem) için 96 kuyucuklu optik pleytler (Applied Biosystem) kullanılarak gerçekleştirilen QRT-PCR reaksiyonları her çalışma

sırasında her gen için bir referans bir hedef gen çalışılarak ve bir de negatif kontrol kullanılarak gerçekleştirildi. Örnek sayısına göre hesaplanan 1x PCR karışımı **Tablo 3.6**'daki gibi hazırlanmıştır;

Tablo 3.6: QRT-PCR reaksiyonu için çalışılacak diziye özgü primer ve enzim karışımı

İçerik	Stok Konsantrasyon	Hacim (µl)	Final Konsantrasyon
Syber Green Master Mix	2x	10	1x
Primer Mix (For +Rev)	10 µM	1	0,5 µM
dH ₂ O (PCR saflığında)	-	4	-
cDNA	100-300 ng	5	25-75 ng
Total	-	20	-

Reaksiyon karışımı reaksiyon tüpünde hazırlandı. Hazırlanan bu karışım 15µl'lik hacimler ile 96 kuyucuklu pleytlere eklendi. Pleyt kuyucuklarının içerisindeki bu karışıma 5 µl kalıp cDNA eklenerek son hacim 20 µl yapıldı. Reaksiyon karışımı pleytlere eklendikten sonra pleytlerin üzeri şeffaf yapışkan bir plastik ile kapatıldı. Hazırlanan bu pleytler, 96 kuyucuklu pleytlere uygun adaptör yerleştirilmiş santrifüjde 100 x g'de 30 saniye santrifüjlendi. Daha sonra bu pleytler StepOnePlus cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki PCR protokolüne (**Tablo 3.7**) göre QRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.7: QRT-PCR protokolü.

PCR aşaması		Siklus Sayısı	Hedef Sıcaklık	Süre
Ön inkübasyon		1	95 °C	10 dakika
Amplifikasyon	Denatürasyon	45	95 °C	10 saniye
	Primer bağlanması		60 °C	30 saniye
	Uzama		72 °C	10 saniye
Soğutma		1	40 °C	30 saniye

Öncelikle herbir genin için farklı örnek titrasyonları kullanılarak standart eğri saptandı. Elde edilen standart eğri üzerinden herbir gen için etkinlik analizi gerçekleştirildi. Etkinlik değeri, belirlenen ve uygun aralıkta çıkan gen çiftleriyle çalışmaya devam edildi. Her iki hücre hattı için belirlenen tüm deneyler için yukarıda belirtilen genlerin ekspresyonunun kantitatif miktarı, her gen için referans gene göre belirlenen ΔCt (döngü eşik değeri, cycling threshold) değeri ($\Delta Ct = Ct^{\text{referans gen}} - Ct^{\text{hedef gen}}$)'ne göre belirlenen transkript seviyesindeki relatif değişiklikler kontrol gen (*HPRT*) ile normalize edildi. İstatistiksel analizler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerine göre gerçekleştirildi.

3.6. İKİLİ İMMÜN FLORESAN İŞARETLEME YÖNTEMİ

MRC5 hücre hattı 10 cm çaplı yuvarlak kültür kabına 6×10^4 hücre olacak şekilde %10 FBS ve %1 streptomisin ve penisilin içeren Ham's/F12 medyum içinde ekildi. Hücreler 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 etüvde inkübe edildiler. Bu sürenin sonunda serum kısıtlı medyuma alınan hücrelere 24 saat sonra PBS içerisinde çözülen TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5}M), ve CGRP (10^{-6}M) peptidleri uygulandı. Uygulamayı takip eden 24., 48. ve 72. saatin sonunda hücreler üzerinden medyum çekilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine soğuk aseton/metanol karışımı eklenerek hücreler fikse edildiler. %0,1 BSA içeren PBS'te yıkanmalarını takiben, hücreler %5 BSA içeren PBS'te bloklandılar. Daha sonra hücreler, 1 gece boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de fare anti- α -SMA (Sigma) ve tavşan anti-kollajen-1 α 1 (Abcam) primer antikorlarıyla inkübe edildi. Bu sürenin sonunda hücreler yıkandı ve daha sonra uygun FITC işaretli tavşan anti-fare (Santa Cruz) ve CY3 işaretli keçi anti-tavşan sekonder antikorlarıyla (Millipore) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildiler. Daha sonra hücreler yıkamayı takiben 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) nükleus boyasıyla işaretlendiler. Bu adımın sonunda hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edildiler. Yıkamanın sonunda MRC5 hücreleri optik geçirgenliği olan kültür kapları üzerinde Nikon Eclipse Ti Invert Floresan mikroskopta görüntülendiler.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

MRC5 ve A549 hücrelerine GRP, CGRP ve TGF- β uyarımları sonucu hücre canlılık testi, BrdU hücre proliferasyonu testi, Western emdirim ve gen ekspresyon analiz sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Graphpad Prism 7,0 yazılım programı kullanıldı. Deney grupları sonuçlarının ortalamaları, standart sapmaları ve gruplar arasındaki karşılaştırmalar One-way ANOVA (Bonferonni'nin çoklu karşılaştırmalar için düzeltmesi kullanılarak) ve *Student T-*

testiyle çift yönlü olarak yapıldı. Hesaplamalar sonucunda p değeri 0,05'ten küçük olan ($p < 0,05$) farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



BULGULAR

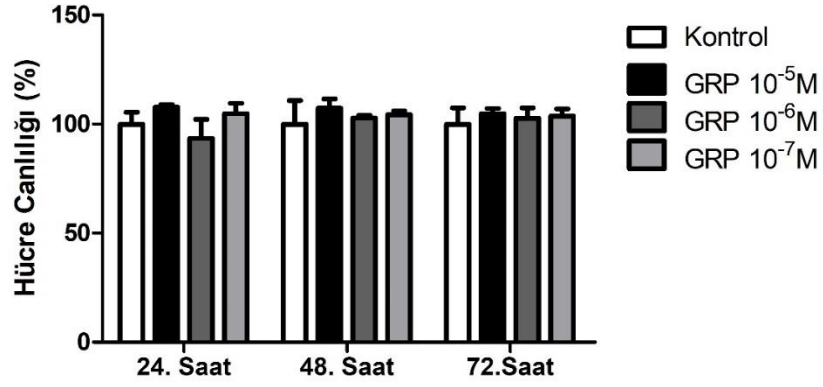
4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

4.1.1. A549 Hücrelerine Ait MTT Bulguları

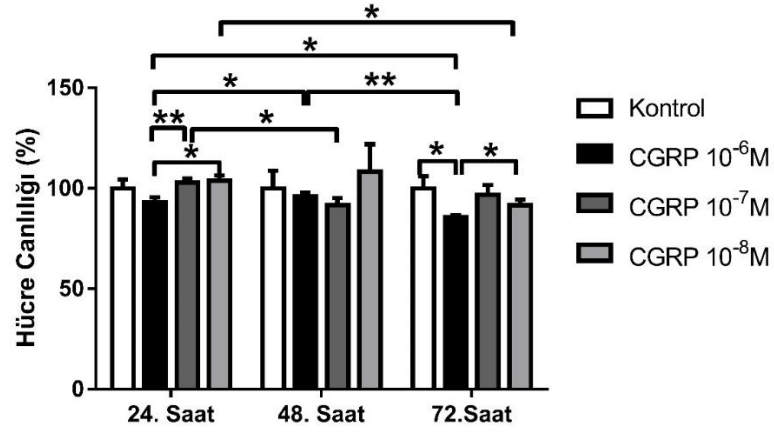
GRP'nin her üç dozu (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M) da A549 hücrelerinin canlılığı üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmadı. Her üç GRP dozu ile uyarılan A549 hücrelerinde hücrelerin canlılığı, kontrol grubu ile kıyaslandığında deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermedi ve hücre canlılığı oranlarının %90-105 gibi yüksek oranlarda olduğu belirlendi (**Şekil 4.1**).

CGRP'nin 10^{-6} M dozu A549 hücrelerinin canlılığını %100'den deneyin 24. saatinde %90, 48. saatinde %96, 72. saatinde ise %85 oranına düşürdü. Hücre canlılığındaki bu düşüşler, kontrol ile kıyaslandığında deneyin 72. saatinde anlamlıydı ($p<0,05$). CGRP'nin 10^{-7} M dozu ile uyarılan A549 hücrelerinde hücre canlılığı oranları deneyin 24. saatinde %102, 48. saatinde %90, 72. saatinde ise %98 olarak belirlendi. Bu hücre canlılığı oranlarındaki değişimler, kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. CGRP'nin 10^{-8} M'lük dozu ise, A549 hücrelerinin canlılığını deneyin 24. ve 48. saatlerinde %100'ün üzerine çıkarırken, deneyin 72. saatinde %90 oranına düşürdü. Hücre canlılığında saptanan bu artış ve azalışlar, kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Her üç CGRP dozunun da A549 hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlendi (**Şekil 4.2**).

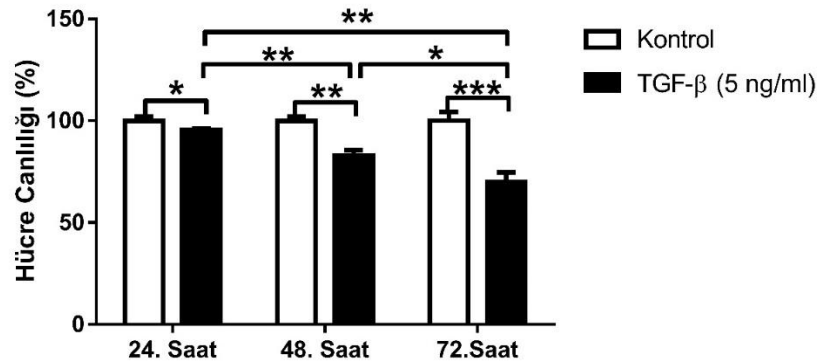
TGF- β (5 ng/ml) ile uyarılan A549 hücrelerinde hücre canlılığı, deneyin 24. ($p<0,05$), 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,001$) saatlerinde zamana bağlı olarak kontrole göre azaldı. Hücre canlılığı kontrolle karşılaştırıldığında deneyin 24. saatinde %90'a 48. saatinde %80'e 72. saatinde de %75'e geriledi (**Şekil 4.3**).



Şekil 4.1: GRP uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri.



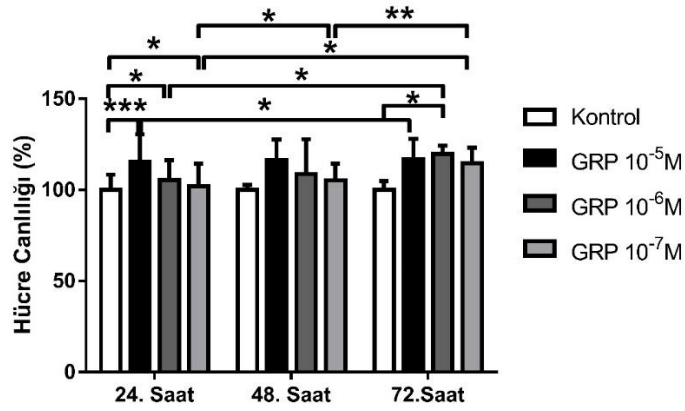
Şekil 4.2: CGRP uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05 ve **p<0,01.



Şekil 4.3: TGF-β uygulamalarının A549 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

4.1.2. MRC5 Hücrelerine Ait MTT Bulguları

GRP'nin her üç dozu (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M) da fibroblast hücrelerinin canlılıklarını %100'ün üzerine çıkardı. GRP'nin 10^{-5} M'lik dozu fibroblastların hücre canlılık oranlarını deneyin 24. (p<0,001), 48. ve 72. saatinde %120'ye çıkardı. 10^{-6} M GRP ile uyarılan fibroblast hücrelerinde hücre canlılığının 24. (p<0,05) ve 48. saatlerde %110'a 72. (p<0,05) saatlerde %122'ye yükseldiği tesbit edildi. GRP'nin 10^{-7} M konsantrasyonu ise fibroblastların hücre canlılık oranlarını deneyin 24. saatinde %105'e (p<0,05), 48. saatinde %107'ye, 72. saatinde ise %118'e yükseltti (Şekil 4.4).

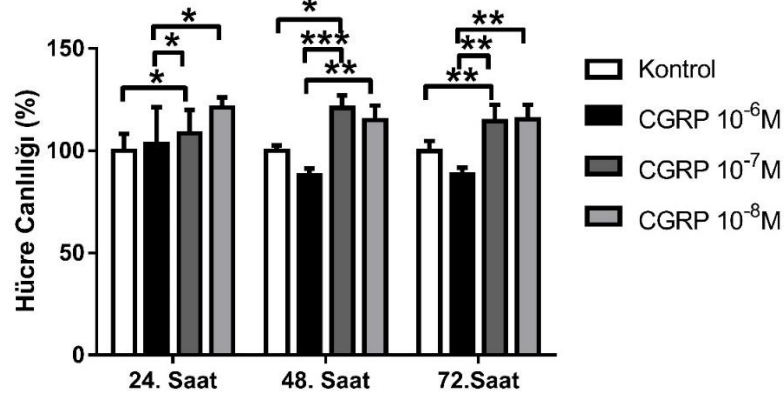


Şekil 4.4: GRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

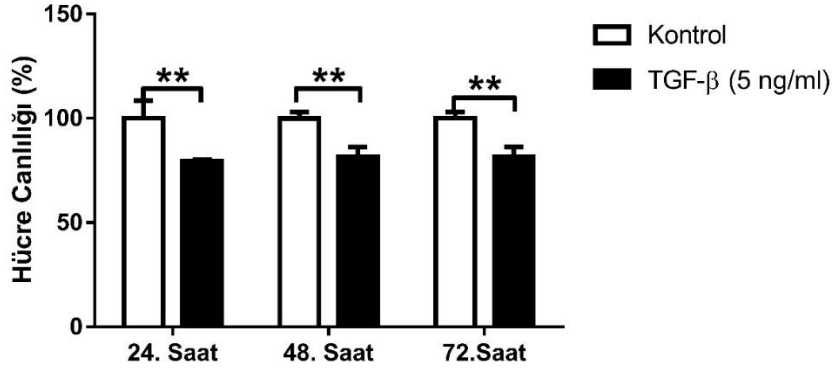
CGRP'nin 10^{-6} M'lik dozu, fibroblastların hücre canlılık oranlarını deneyin 24. saatinde %100'ün üzerine çıkardı, deneyin 48. ve 72. saatlerinde ise sırasıyla %90 ve %92'ye düşürdü. Ancak hücre canlılık oranlarındaki bu değişimler, kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Fibroblastlar 10^{-7} M CGRP ile uyarıldıklarında hücre canlılığı kontrolle kıyaslandığında ilk 24 saatte %100'den %110'a (p<0,05), deneyin 48. saatinde %120'ye (p<0,05), deneyin 72. saatinde ise %115'e (p<0,01) yükseldi. CGRP'nin 10^{-8} M'lik dozu ise, fibroblastların hücre canlılık oranlarını deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde kontrolle kıyaslandığında zamana bağlı olarak arttırdı. Her üç CGRP dozunun da genel olarak fibroblastların hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemedikleri ve hücre canlılık oranlarının özellikle deneyin 48. ve 72. saatlerinde %100'ün üzerine çıktığı saptandı (Şekil 4.5).

TGF- β uygulamaları fibroblast hücrelerinin canlılığını deneyin 24. (p<0,01), 48. (p<0,01) ve 72. (p<0,01) saatlerinde zamana bağlı olarak kontrole göre anlamlı düzeylerde azalttı. Hücre

canlılığı kontrolle karşılaştırıldığında deneyin 24. saatinde %75'e, 48. ve 72. saatlerde %78'e geriledi (Şekil 4.6).



Şekil 4.5: CGRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.



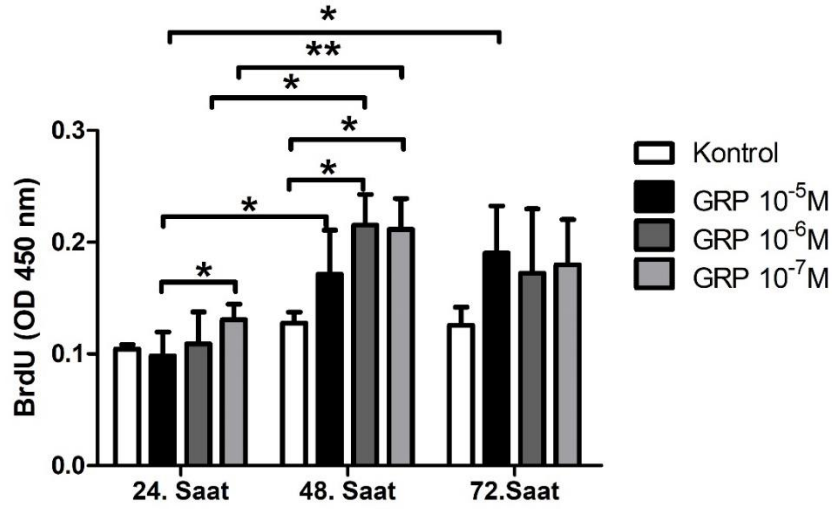
Şekil 4.6: TGF-β uygulamalarının MRC5 hücrelerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: **p<0,01.

4.2. HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ BULGULARI

4.2.1. A549 Hücrelerinin Proliferatif Yanıtı

GRP'nin 10⁻⁵ M dozu ile uyarılan A549 hücrelerinde, BrdU seviyesi deneyin ilk 24 saatinde önemsiz miktarda azalırken, deneyin 48. ve 72. saatlerinde kontrolle kıyaslandığında arttı. Bu artış anlamlı değildi. GRP'nin 10⁻⁶ M dozu, A549 hücrelerinde BrdU seviyesi sadece deneyin 48. saatinde kontrole kıyasla anlamlı ölçüde arttırdı (p<0,05). GRP'nin 10⁻⁷ M dozu ise A549 hücrelerinde BrdU seviyesini deneyin 48. saatinde kontrole kıyasla anlamlı ölçüde arttırdı (p<0,05). Her üç GRP dozundan 10⁻⁵ M GRP dozunun A549 hücrelerinin proliferasyonunu

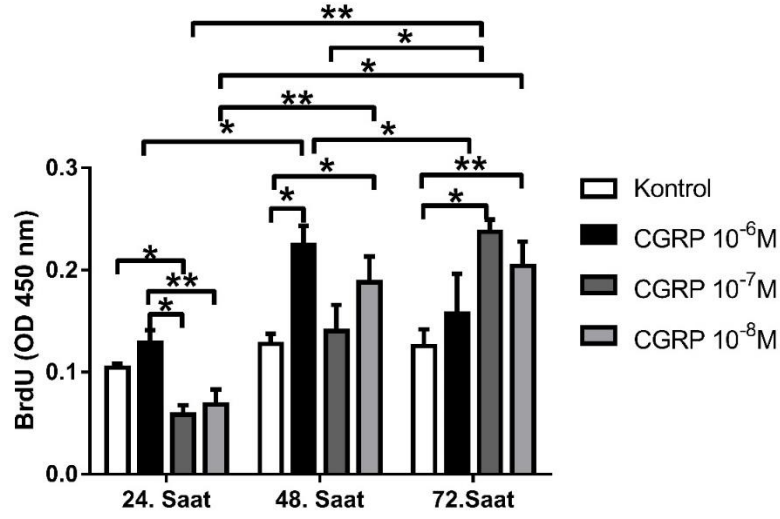
anlamli ölçüde uyarmadığı, 10^{-6} M ve 10^{-7} M GRP dozlarının ise A549 hücre proliferasyonunu uyarma yönünde etki gösterdikleri saptandı (Şekil 4.7).



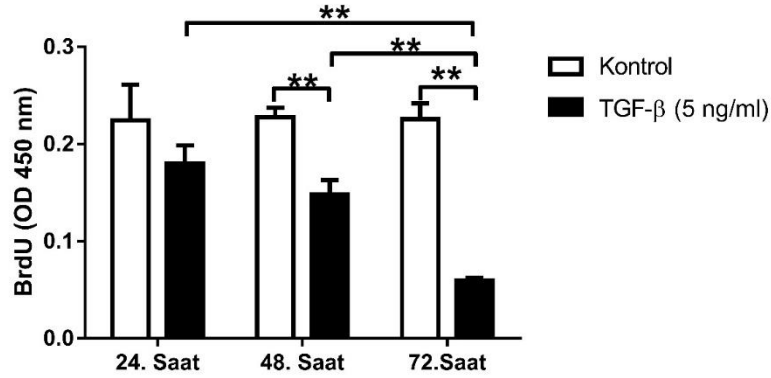
Şekil 4.7: GRP uygulamalarının A549 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$.

CGRP'nin 10^{-6} M dozu, A549 hücrelerinde BrdU seviyesini deneyin 48. saatinde kontrole kıyasla anlamlı düzeyde arttırdı ($p<0,05$). CGRP'nin 10^{-7} M dozu ise A549 hücrelerinde BrdU seviyesini deneyin 24. saatinde kontrole kıyasla anlamlı ölçüde düşürdü ($p<0,05$), deneyin 48. ve 72. saatlerinde ise arttırdı; 72. saatteki artış kontrole göre anlamlıydı ($p<0,05$). CGRP'nin 10^{-8} M dozu ile uyarılan A549 hücrelerinde BrdU seviyesinin, deneyin 48. ($p<0,05$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yükseldiği saptandı. Her üç doz içerisinde 10^{-8} M CGRP dozu, A549 hücre proliferasyonunu uyarmada en etkili doz olarak tespit edildi. Tüm bu sonuçlara göre, CGRP'nin her üç dozunun da genel olarak A549 proliferasyonunu doz artışına ve zamana bağlı olarak arttırdığı belirlendi (Şekil 4.8).

TGF- β uygulaması A549 hücrelerinin BrdU seviyesini deneyin 24., 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde zamana bağlı olarak kontrole göre azalttı. Bu azalışlar deneyin 48 ve 72 saatlerinde istatistiksel olarak anlamlıydı (Şekil 4.9).



Şekil 4.8: CGRP uygulamalarının A549 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05 ve **p<0,01.

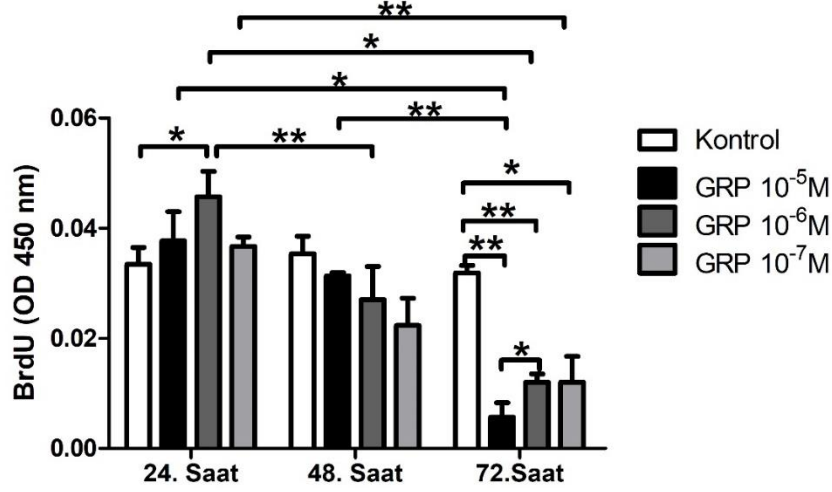


Şekil 4.9: TGF-β uygulamalarının A549 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: **p<0,01.

4.2.2. MRC5 Hücrelerinin Proliferatif Yanıtı

GRP uygulamaları her üç dozunun (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M) da ilk 24 saatte MRC5 hücrelerinde BrdU seviyesini arttırdığı saptandı. Bu artış 10^{-7} M konsantrasyonunda kontrole göre anlamlı düzeydedi ($p<0,05$). Her üç doz da fibroblast hücrelerinin BrdU seviyelerini deneyin 48. ve özellikle 72. (10^{-5} ve 10^{-6} M GRP için $p<0,01$; 10^{-7} M GRP için $p<0,05$) saatlerinde kontrole göre azalttığı dikkati çekti. GRP'nin her üç dozunun da ilk 24 saate hücre proliferasyonunu

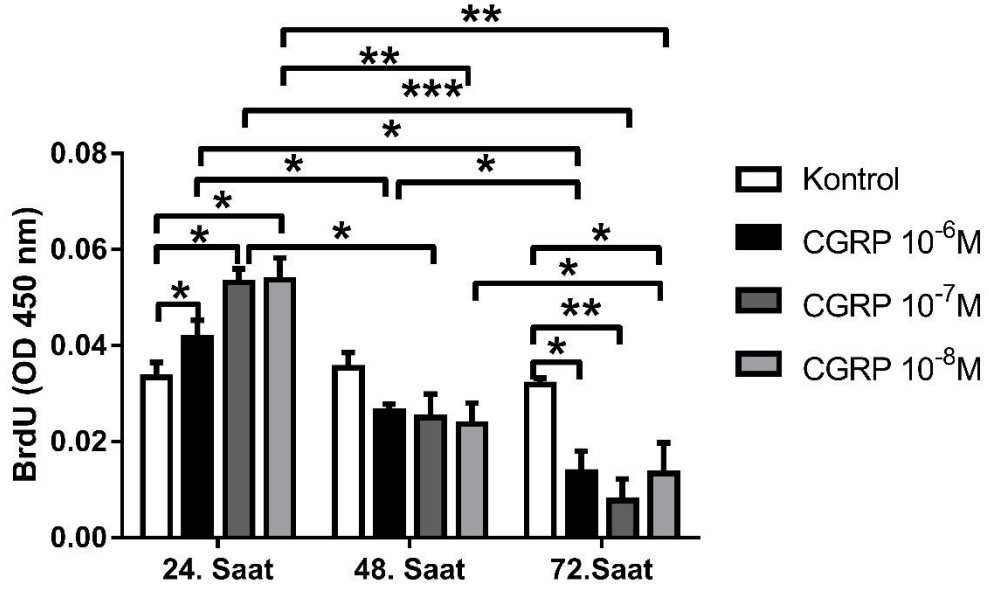
uyarma yönünde etki gösterse de zaman ilerledikçe hücre proliferasyonunu azaltma yönünde etki gösterdikleri belirlendi. GRP'nin 10^{-5} ve 10^{-6} M konsantrasyonları fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu azaltmada oldukça etkiliydiler (Şekil 4.10).



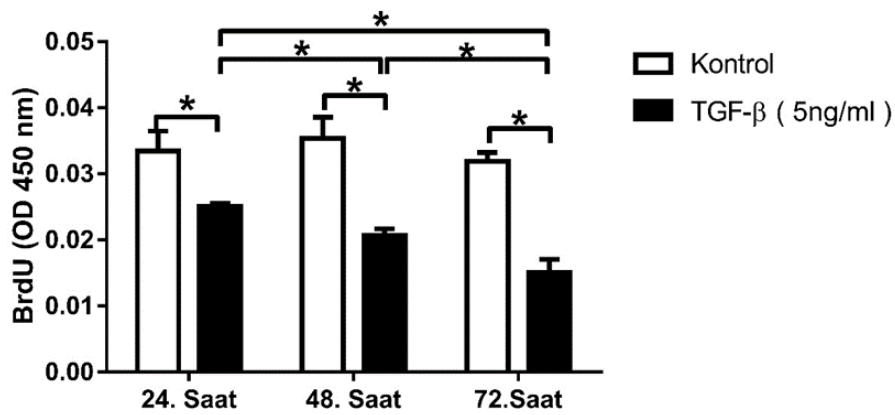
Şekil 4.10: GRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$.

CGRP'nin her üç dozu (10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} M) da MRC5 hücrelerinde ilk 24 saatte BrdU seviyesini kontrole göre anlamlı düzeylerde arttırdı ($p<0,05$). Bu artış, 10^{-7} M ve 10^{-8} M konsantrasyonlarda daha fazlaydı. CGRP'nin her üç dozu deneyin 48. saatinden itibaren hücrelerdeki BrdU seviyesini azaltmaya başladı, ancak bu etkinin deneyin 72. saatinde daha belirgin olduğu belirlendi. Özellikle, 10^{-6} M ve 10^{-8} M CGRP konsantrasyonları MRC5 hücrelerinde BrdU seviyelerini 72. saatte 24. ve 48. saatlere göre anlamlı düzeylerde azalttı (her iki doz için $p<0,05$). Deneyin 72. saatindeki BrdU seviyelerine göre, CGRP'nin her üç dozu da bu saatte anti-proliferatif bir etkiye sahip olmasına rağmen, 10^{-6} ve 10^{-7} M konsantrasyonun diğerlerine göre fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu azaltma yönünde daha etkili olduğu belirlendi. CGRP (10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} M) uygulamaları MRC5 insan fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu erken dönemde uyarırken, geç dönemlerde bu hücreler üzerinde anti-proliferatif bir etki gösterdi (Şekil 4.11).

TGF- β uygulamaları fibroblastlardaki BrdU seviyelerini kontrolle kıyaslandığında zamana bağlı olarak azaltmaktadır ($p<0,05$). BrdU seviyeleri deneyin 72. saattinde en düşük seviyelerde bulunmaktadır ($p<0,05$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.11: CGRP uygulamalarının MRC5 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.



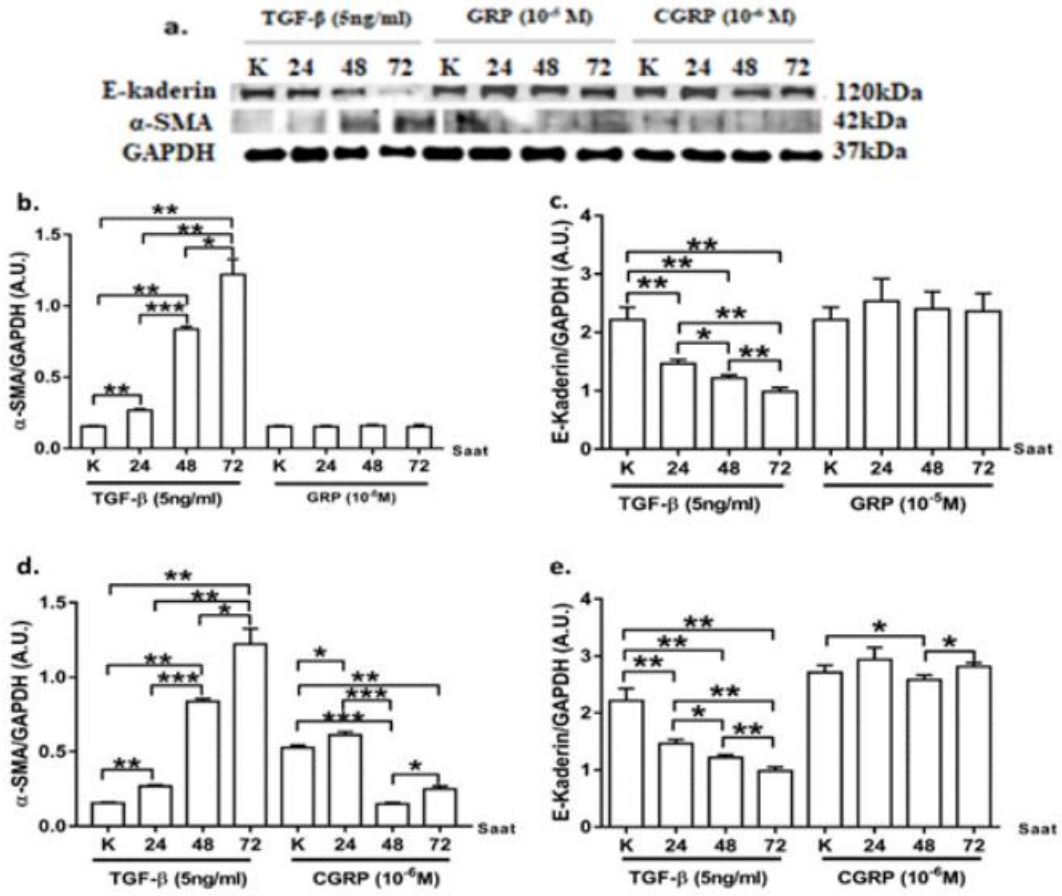
Şekil 4.12: TGF- β uygulamalarının MRC5 hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkileri. BrdU seviyelerindeki değişim hücre proliferasyonundaki değişimi yansıtmaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi: * $p<0,05$.

Hücre canlılığı testi ve BrdU proliferasyon testleri sonuçlarına dayanarak, GRP ve CGRP dozları içinden hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemeyen ve hücre proliferasyonunu uyarmayan dozlar A549 ve MRC5 hücrelerinde miyofibroblast farklılaşmasını uyarabilecek dozlar olarak seçildi. Bu dozlar GRP için 10^{-5} M, CGRP için ise 10^{-6} M idi.

4.3.WESTERN EMDİRİM BULGULARI

4.3.1. GRP ve CGRP ile Uyarılan A549 Hücrelerinde EMT Uyarımının Değerlendirilmesi

GRP'nin 10^{-5} M dozu ile uyarılan A549 hücrelerinde, deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde α -SMA ve E-kaderin protein seviyelerinde kontrolle (0. saat) kıyaslandığında anlamlı bir değişim olmadığı saptandı. CGRP'nin 10^{-6} M dozu ile uyarılan A549 hücrelerinde ise, deneyin 48. ($p<0,001$) ve 72. saatlerinde ($p<0,01$) α -SMA protein seviyelerinde 0. saate göre anlamlı bir azalma gözlenirken, E-kaderin protein seviyeleri 0. saatle karşılaştırıldığında 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı ($p<0,05$), 72. saatte ise 48. saate göre anlamlı bir artış sergiledi ($p<0,05$). Güçlü bir EMT uyarıcısı olarak bilinen TGF- β ile yapılan deneylerde ise, TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinde α -SMA protein miktarı deneyin 24., 48. ve 72 saatlerinde zamana bağlı olarak anlamlı ölçüde arttı ($p<0,01$). E-kaderin protein seviyeleri ise zamana bağlı olarak azaldı ($p<0,01$) (Şekil 4.13 a-e).

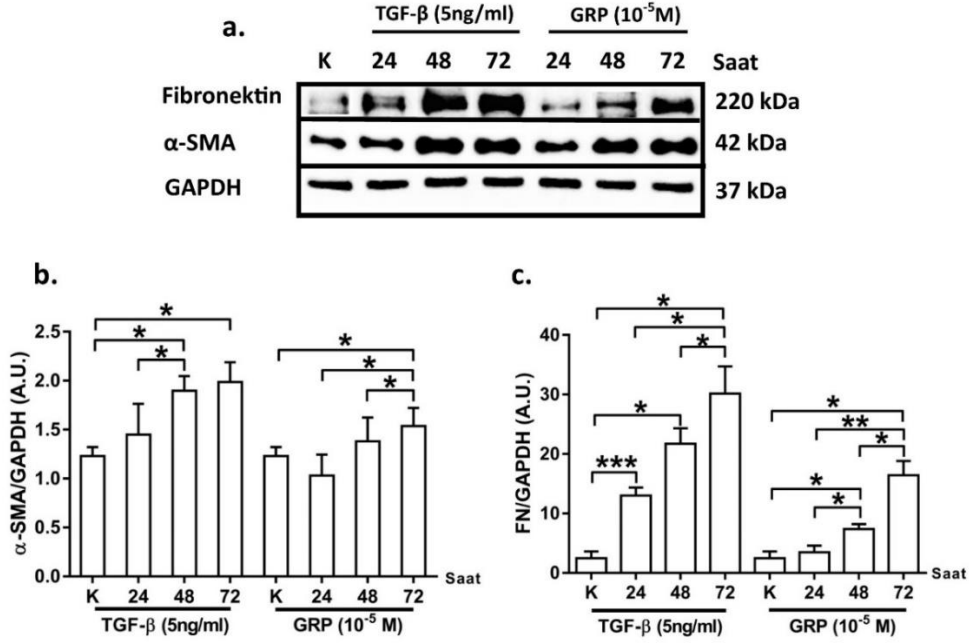


Şekil 4.13: TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M)'nin A549 hücrelerinde EMT sürecine etkisi. α -SMA ve E-kaderin protein bandları (a) ile α -SMA ve E-kaderin protein seviyelerindeki değişimler gösterilmiştir (b-e). K: 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

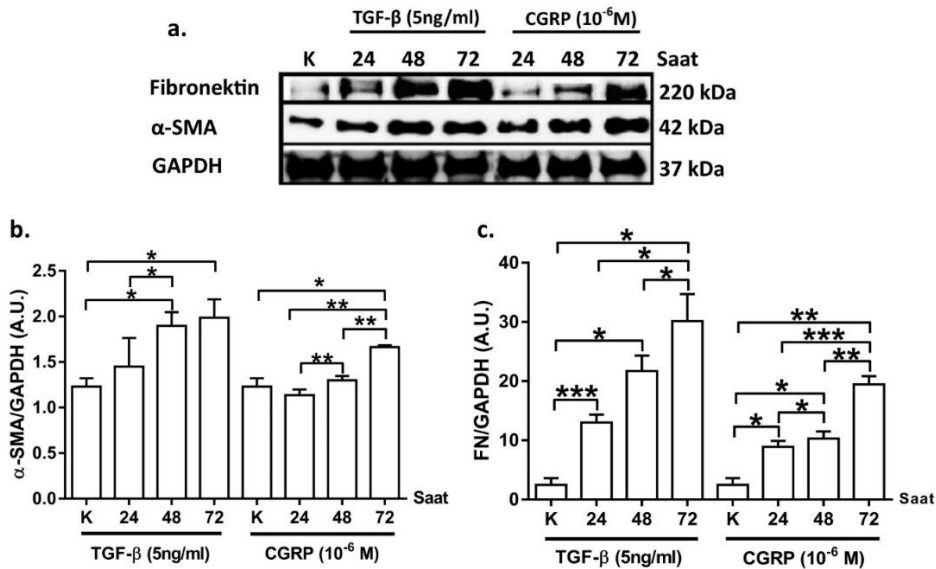
4.3.2. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Fibroblast-Miyofibroblast Farklaşmasının Değerlendirilmesi

GRP'nin 10^{-5} M dozu ile uyarılan MRC5 fibroblast hücrelerinde, deneyin 48. saatinden itibaren α -SMA miktarında bir artış gözlemlense de 0. saatle karşılaştırıldığında 72. saatte anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Fibronektin protein seviyelerinin önemli düzeyde arttığı zaman dilimi ilk 48 saattir ($p < 0,05$) ve bu artış 72. saatte ($p < 0,05$) pik yapmaktadır (Şekil 4.14 a-c). CGRP'nin 10^{-6} M dozu ile uyarılan MRC5 hücrelerinde ise, α -SMA protein seviyelerinde deneyin 72. saatinde 0. saate göre anlamlı bir artış ($p < 0,05$) tespit edildi. Fibronektin protein seviyeleri de 0. saate göre deneyin 24 ($p < 0,05$), 48 ($p < 0,05$) ve 72. ($p < 0,01$) saatlerinde istatistiksel olarak önemli düzeylerde arttı. Bu artış 72. saatte en yüksek seviyesine ulaştı. Bununla birlikte, GRP ve CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerindeki α -SMA ve

fibronektin protein miktarlarındaki artışlar, TGF- β ile uyarım sonrasında görülen α -SMA ve fibronektin protein miktarlarındaki artışlardan daha azdır (Şekil 4.14 a-c ve Şekil 4.15 a-c).



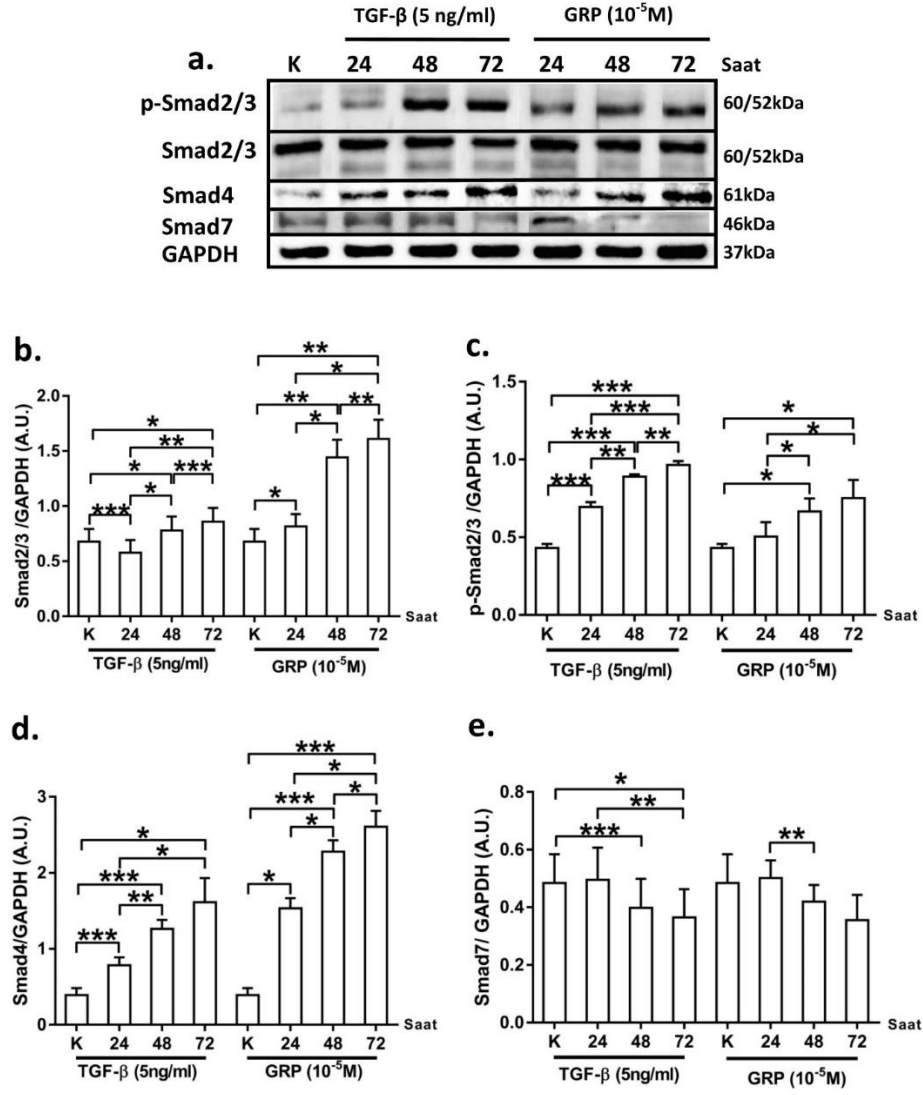
Şekil 4.14: Şekilde TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10⁻⁵ M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde α -SMA ve fibronektin (FN) protein bandlar (a) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (b ve c) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.



Şekil 4.15: Şekilde TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10⁻⁶ M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde α -SMA ve fibronektin (FN) protein bandlar (a) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (b ve c) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

4.3.3. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde TGF- β 1/Smad Sinyal Yolağı Proteinleri Bulguları

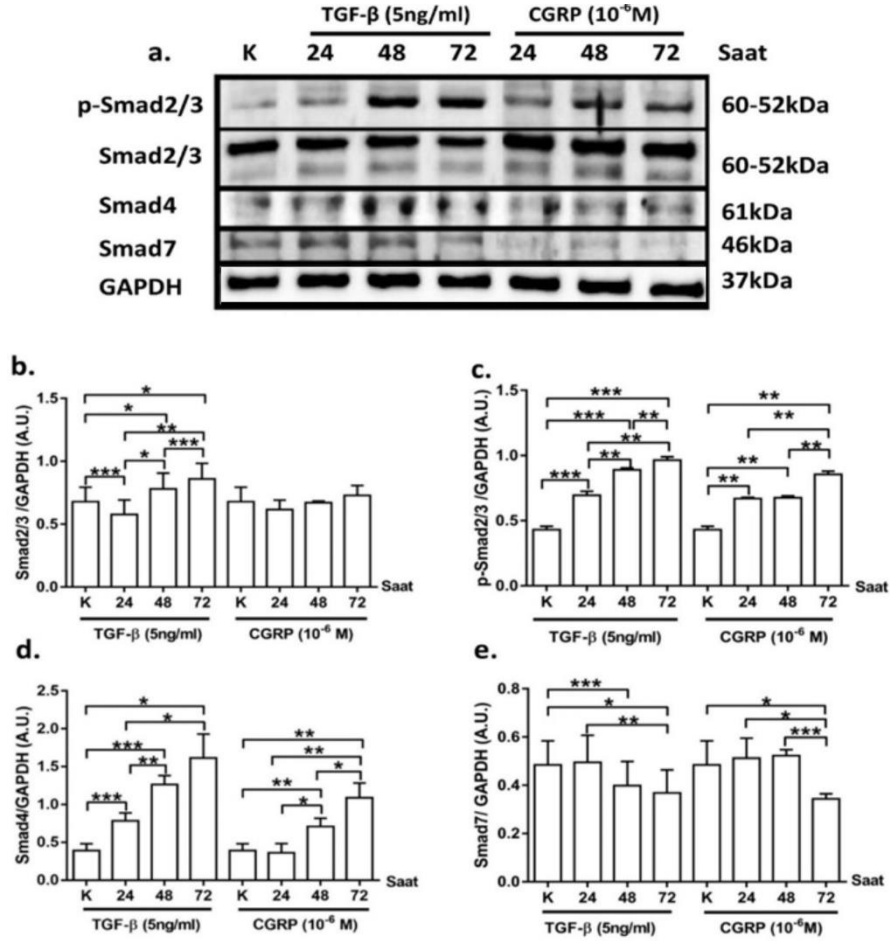
GRP'nin 10^{-5} M dozu ile uyarılan MRC5 fibroblast hücrelerinde total-Smad2/3 ve Smad4 seviyeleri deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttı (**Şekil 4.16**). GRP, bu proteinlerin seviyelerini ilk 24 saatte arttırmaya başladı (total-Smad2/3 ve Smad4 için $p < 0,05$). Daha sonra 48. saatte biraz daha arttırarak (total-Smad2/3 $p < 0,01$ ve Smad4 için $p < 0,001$) bu proteinlerin seviyesini 72. saatte maksimum seviyeye ulaştırdı (total-Smad2/3 için $p < 0,01$ ve Smad4 için $p < 0,001$). Bu artış, TGF- β ile uyarımı sonrasında görülen total-Smad2/3 ve Smad4 protein seviyelerindeki artıştan daha yüksekti. p-Smad2/3 (aktif form) protein seviyeleri ise deneyin 48. ve 72. saatlik dilimlerinde 0. saate kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde GRP tarafından arttırıldı ($p < 0,05$). Bu artış, TGF- β ile uyarımı sonrasında görülen p-Smad2/3 protein seviyesindeki artıştan daha azdı. Bir diğer Smad proteini olan Smad7 protein seviyeleri ise deneyin 48. saat diliminden itibaren azalsa da bu azalışlar 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Smad7 protein miktarlarında gözlenen değişimlerin, TGF- β ile uyarılan MRC5 hücrelerindeki benzer özellikler gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.16 a-e**).



Şekil 4.16: Şekilde TGF-β (5ng/ml) ve GRP (10⁻⁵ M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde total Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4 ve Smad7 protein bandları (a) ile bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (b-e) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

CGRP'nin 10⁻⁶ M dozu ile uyarılan MRC5 hücrelerinde total-Smad2/3 seviyelerinde deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı. TGF-β ile uyarılan MRC5 hücrelerinde ise total-Smad2/3 protein seviyeleri ilk 24 saatte istatistiksel olarak azaldı, ancak daha sonra bu protein miktarı 48. ve 72. saatlerde bir artış gösterdi (p<0,05). CGRP, p-Smad2/3 protein seviyelerini deneyin 24. ve 48. saatlerinde arttırdı (p<0,01); deneyin 72 saatinde ise bu artış daha da yükseldi (p<0,01). p-Smad2/3 protein seviyelerindeki bu artış profili, TGF-β ile uyarılan MRC5 hücrelerinde gözleneneye benzerdi. CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Smad4 protein seviyeleri ilk 24 saatte değişmezken, 48. (p<0,01) ve 72. (p<0,01) saatlerde 0.

saate kıyasla önemli düzeylerde arttı. Smad4 seviyelerindeki bu artış, TGF- β ile uyarılan hücrelerde görülenden daha azdı. CGRP, Smad7 protein seviyelerini ilk 48 saatte anlamlı ölçüde değiştirmezken, 72. saat diliminde 0., 24., ve 48. saat dilimlerine göre istatistiksel olarak önemli düzeylerde Smad7 protein seviyelerini azalttı ($p<0,05$). Bu azalma TGF- β 'nın 72.saatteki etkisine benzerdi (Şekil 4.17 a-e).



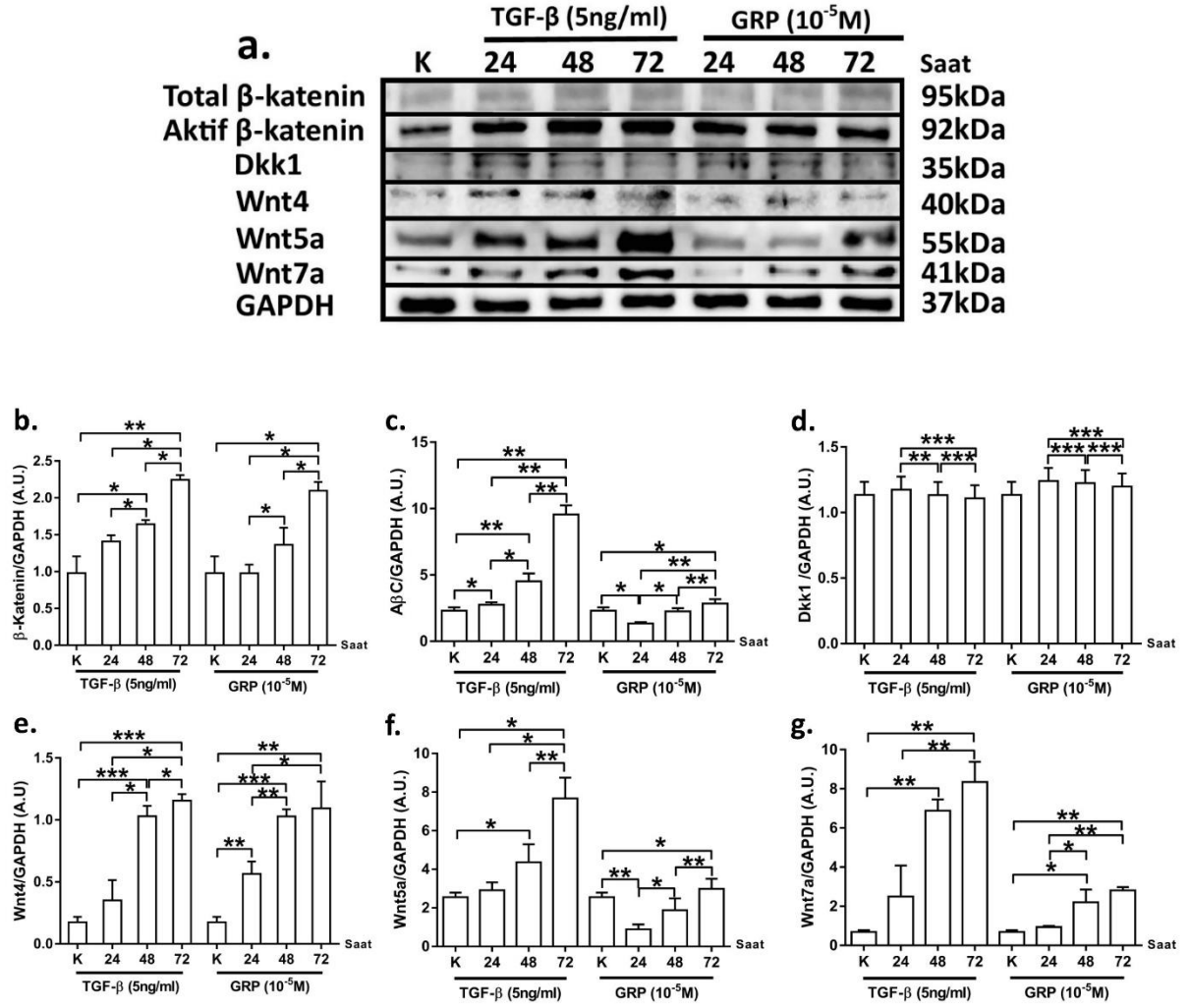
Şekil 4.17: TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde total Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4 ve Smad7 protein bandları (a) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (b-e) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

4.3.4. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Wnt Sinyal Yoluğı Proteinlerine Ait Bulgular

GRP, MRC5 hücrelerinde total β -katenin protein seviyesini 72. saatte arttırdı. Bu artış, 0., 24. ve 48. saatlerde gözlenen total β -katenin seviyeleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık taşımaktaydı ($p<0,05$). GRP, aktif β -katenin protein seviyelerini ilk 24 saat'lik dilimde 0. saate

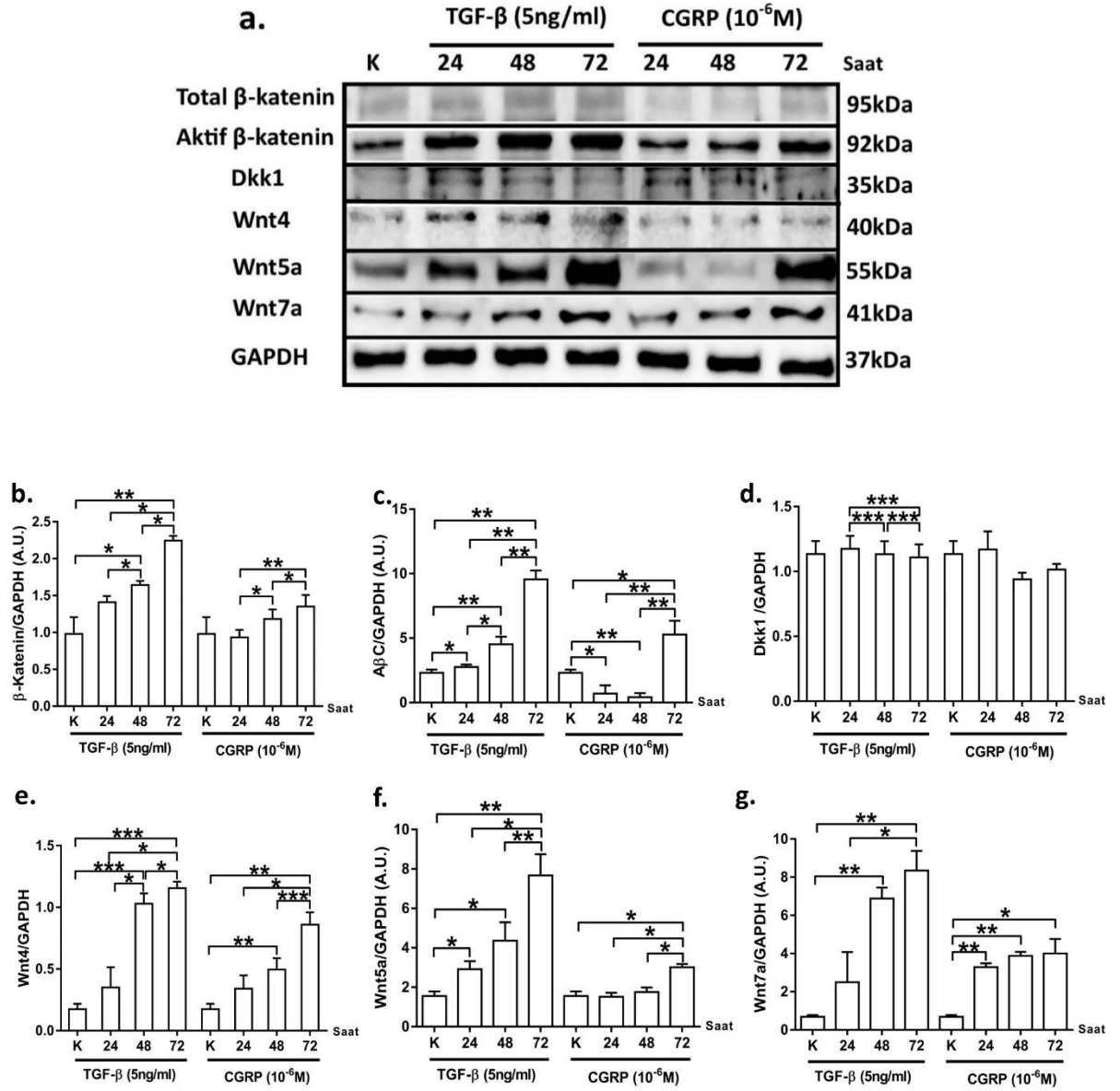
göre anlamlı düzeyde azaltmasına rağmen ($p<0,05$), 48.saat diliminden itibaren arttırmaya başladı. Deneyin 48 ve 72. saatlerinde görülen bu artış 0. saatle karşılaştırıldığında sadece 72. saatte anlamlı düzeydeydi ($p<0,05$) (**Şekil 4.18**). GRP uyarımı, MRC5 hücrelerinde deneyin 24. saattinden 72. saat dilimine kadar olan süreçte Dkk1 seviyelerinde önemli bir değişime neden olmadı. MRC5 hücreleri GRP uyarımını takip eden süreçte Wnt4 protein seviyelerini deneyin 24. ($p<0,01$), 48. ($p<0,001$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde zamanla doğru orantılı olarak anlamlı miktarda arttırdı. Wnt5a seviyesi ise GRP uyarımını takip eden ilk 24 saatte azaldı ($p<0,01$). Ancak, deneyin 72. saatinde Wnt5a seviyesi tekrar arttı, bu artış 0. saatle karşılaştırıldığında anlamlıydı ($p<0,05$). GRP, MRC5 hücrelerinde uyarımı takip eden ilk 24 saatten itibaren Wnt7a seviyesini arttırdı, 0. saatle karşılaştırıldığında özellikle 48. ($p<0,05$) ve 72. ($p<0,01$) saatte gözlenen artış anlamlıydı (**Şekil 4.18**). TGF- β uyarımı, GRP uyarımından farklı olarak, uyarımı takip eden 24., 48. ve 72. saatlerde total- β -katenin, aktif- β -katenin, Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a protein seviyelerini, daha güçlü bir şekilde, zamanla arttırmaktaydı (**Şekil 4.18 a-e**).

CGRP uyarımı sonucunda MRC5 hücrelerinde total β -katenin protein seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir. Ancak bu artış anlamlı bir artış değildi. CGRP, aktif β -katenin protein seviyelerini 24. ($p<0,05$) ve 48. ($p<0,01$) saatlerde anlamlı düzeylerde azaltırken 72. ($p<0,05$) saatte 0., 24., ve 48. saate göre anlamlı düzeyde arttırmaktaydı. CGRP, MRC5 hücrelerinde Dkk1 protein seviyelerinde anlamlı bir değişime sebep olmadı. TGF- β ile uyarım sonrasında Dkk1 protein seviyeleri 48. saatten 72. saate doğru bir azalma profili göstermektedir (**Şekil 4.19**). CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Wnt4 protein seviyeleri deneyin 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde arttı. Bu artışın istatistiksel anlamlılığa sahip olmamakla birlikte ilk 24 saatte başladığı ve 72. saatte iki katına yükseldiği dikkati çekmektedir. Bu artış TGF- β 'nin Wnt4 protein seviyeleri üzerindeki etkisiyle benzer profil ve seviyeleri göstermektedir. Wnt5a protein seviyeleri, CGRP uygulamasının ilk 48 saatinde kontrolle aynı seviyelerdedir, ancak deneyin 72. saatinde ($p<0,05$) deneyin 0., 24. ve 48. saatlerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artmaktadır. CGRP'nin Wnt5a



Şekil 4.18: TGF- β (5ng/ml) ve GRP (10^{-5} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Wnt sinyal yolunda görevli olan β -katenin, aktif β -katenin (A β C), Dkk1, Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a protein bandları (a) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (b-g) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

üzerine etkisi TGF- β 'nin etkisinden daha zayıftır. Wnt7a protein seviyeleri ise CGRP uygulamasını takip eden 24. ($p < 0,01$), 48. ($p < 0,01$) ve 72. ($p < 0,05$) saat dilimlerinde 0. saate göre istatistiksel olarak önemli düzeylerde arttı. Bu artış 24. saat diliminden itibaren gözlemlenmiştir. CGRP'nin Wnt7a üzerine etkisi TGF- β 'nin etkisinden daha zayıftır, ancak benzer artış profili göstermektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: TGF- β (5ng/ml) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Wnt sinyal yolunda görevli olan β -katenin, Aktif β -katenin (A β C), Dkk1, Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a protein bandları (a) ve bu proteinlerin seviyelerinde meydana gelen değişimler (b-g) gösterilmektedir. **K:** 0. saat. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$.

4.4. GEN EKSPRESYON BULGULARI

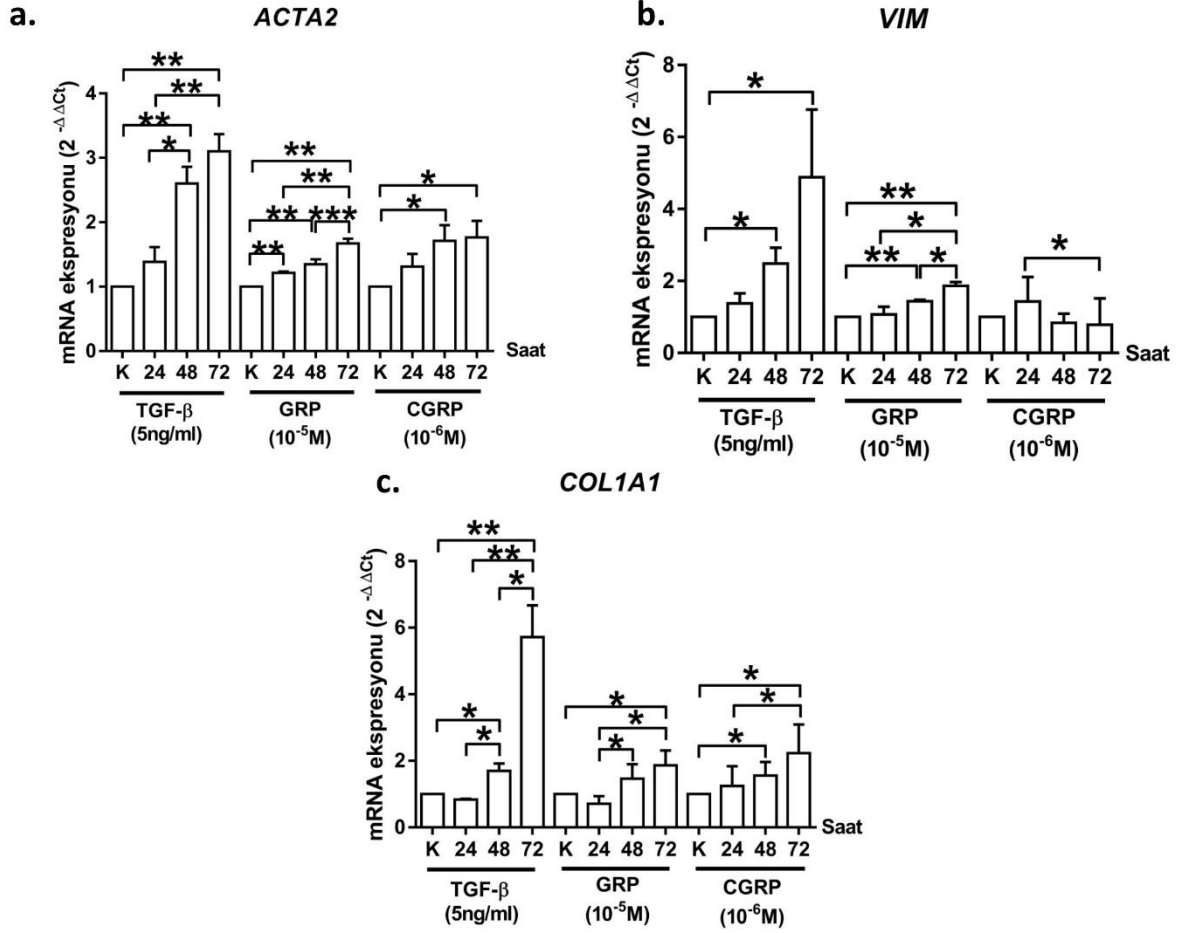
4.4.1. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Fibroblast-Miyofibroblast Farklaşması ile İlişkili Genlere Ait Bulgular

GRP, MRC5 hücrelerinde *ACTA2* gen ekspresyonunu deneyin 24, 48 ve 72. saatlerinde 0. saate göre önemli düzeylerde arttırdı. İlk 24 saatte başlayan *ACTA2* mRNA artışı ($p < 0,01$), deneyin 48 ($p < 0,01$) ve 72. ($p < 0,01$) saatlerinde de zamana bağlı olarak giderek arttı.

CGRP ise fibroblast hücrelerinde *ACTA2* gen ekspresyon seviyelerini deneyin 48. ($p<0,05$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerinde 0. saate göre önemli düzeylerde arttırdı. Anlamlı artış ilk 48. saatte başlayıp 72. saatte yüksek seviyelere ulaşmıştır. GRP ve CGRP tarafından kontrol edilen zamana bağlı *ACTA2* mRNA artış profilleri, TGF- β ile uyarılan MRC5 hücrelerindeki *ACTA2* gen ekspresyonundaki değişimlere benzer profil sergilediler. Ancak, bu iki peptidin *ACTA2* gen ekspresyonu üzerindeki etkisi, TGF- β kadar güçlü değildi (**Şekil 4.20a**).

GRP, MRC5 hücrelerinde vimentin (*VIM*) gen ekspresyon seviyelerini deneyin 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırırken, CGRP bu hücrelerde *VIM* gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artışa neden olmadı. GRP ile modüle edilen *VIM* mRNA artış profili, TGF- β ile uyarılan MRC5 hücrelerindeki *VIM* mRNA seviyesindeki değişimlere benzer profil sergilemelerine rağmen, GRP, TGF- β kadar güçlü bir uyarım göstermedi (**Şekil 4.20b**).

MRC5 hücrelerindeki *COL1A1* mRNA seviyeleri GRP uygulamasını takip eden ilk 24 saatte bir miktar azaldı, daha sonra 48 ve 72. saatlerinde 24. saate göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi. *COL1A1* mRNA seviyesinde 72. saatteki artış 0. saatle karşılaştırıldığında anlamlı düzeydeydi ($p<0,05$). Benzer şekilde CGRP de (bir miktar arttırmasına rağmen) MRC5 hücrelerinin *COL1A1* mRNA seviyelerini 48. ($p<0,05$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerde 0. saate göre anlamlı ölçüde arttırdı. TGF- β 'nın, MRC5 hücrelerinde *COL1A1* gen ekspresyonunu uyardı bu iki peptide göre daha güçlü bir sinyal olarak görev yaptığı görüldü. TGF- β , bu hücrelerde *COL1A1* mRNA seviyelerini uyarımı takip eden 48. saatten itibaren anlamlı olarak arttırdı (48. saat için ($p<0,05$) ve 72. saat için $p<0,01$; **Şekil 4.20c**)

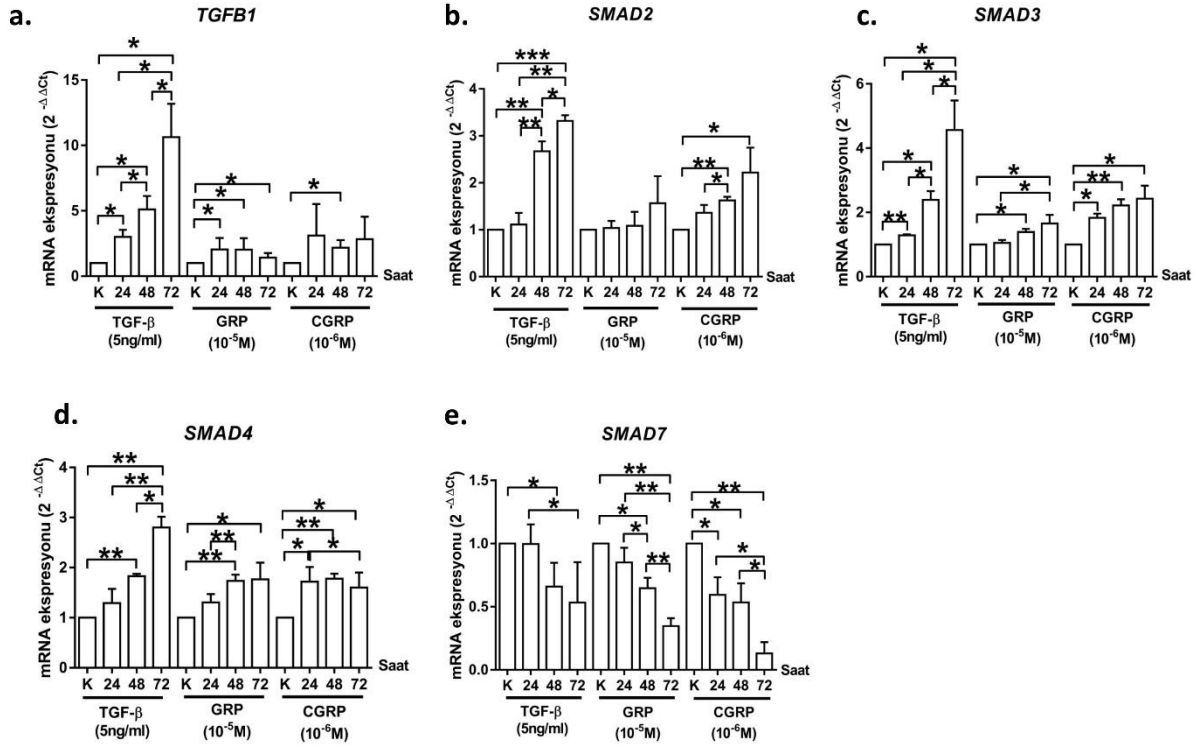


Şekil 4.20: TGF-β (5ng/ml), GRP (10⁻⁵ M) ve CGRP (10⁻⁶ M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *ACTA2* (a), *VIM* (b) ve *COL1A1* (c) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. **K:** deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001 olarak gösterilmektedir.

4.4.2. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde TGF-β1/Smad Sinyal Yolağı ile İlişkili Genlere Ait Bulgular

GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde, uyarımı takip eden zamanlarda *TGFβ1* gen ekspresyon seviyelerini 24. 48. ve 72. saatlerde 0. saate göre anlamlı düzeylerde artırdı (p<0,05). GRP uyarımı sonrası *SMAD2* geninin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.21). GRP uyarımı *SMAD3* ve *SMAD4* genlerinin seviyelerini ise deneyin 48. ve 72. saatlerinde, 0. saat ile karşılaştırıldığında anlamlı ölçüde arttırdı (*SMAD3* geni için p<0,05; *SMAD4* geni için p<0,05 ve p<0,01). GRP, TGF-β'ya göre *TGFβ1* gen ekspresyonunu daha az uyarmaktadır. GRP'nin *SMAD4* gen ekspresyonunu uyarmadaki etkisi ilk 48 saatte TGF-β'ninkine benzerken, 72. saatte TGF-β'ya göre *SMAD4* gen ekspresyonunu daha az uyarmıştır. GRP uygulaması *SMAD7* gen ekspresyon seviyelerini 24., 48. (p<0,05) ve

72. ($p<0,01$) saatlerde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azaltdı. Bu azalış 24. saatte başladı ve 72. saatte en yüksek seviyeye ulaştı. *SMAD7* gen ekspresyon seviyeleri üzerine GRP'nin etkisi, TGF- β 'ya göre daha güçlüydü ve her iki peptid de *SMAD7* gen ekspresyonunda benzer azalış profiline neden oldular. TGF- β , GRP'den farklı olarak *SMAD2* genlerinin ekspresyonunu zamana bağlı olarak uyardı (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: TGF- β (5ng/ml), GRP (10⁻⁵M) ve CGRP (10⁻⁶M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *TGFBI* (a), *SMAD2* (b), *SMAD3* (c), *SMAD4* (d) ve *SMAD7* (e) gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. **K:** deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

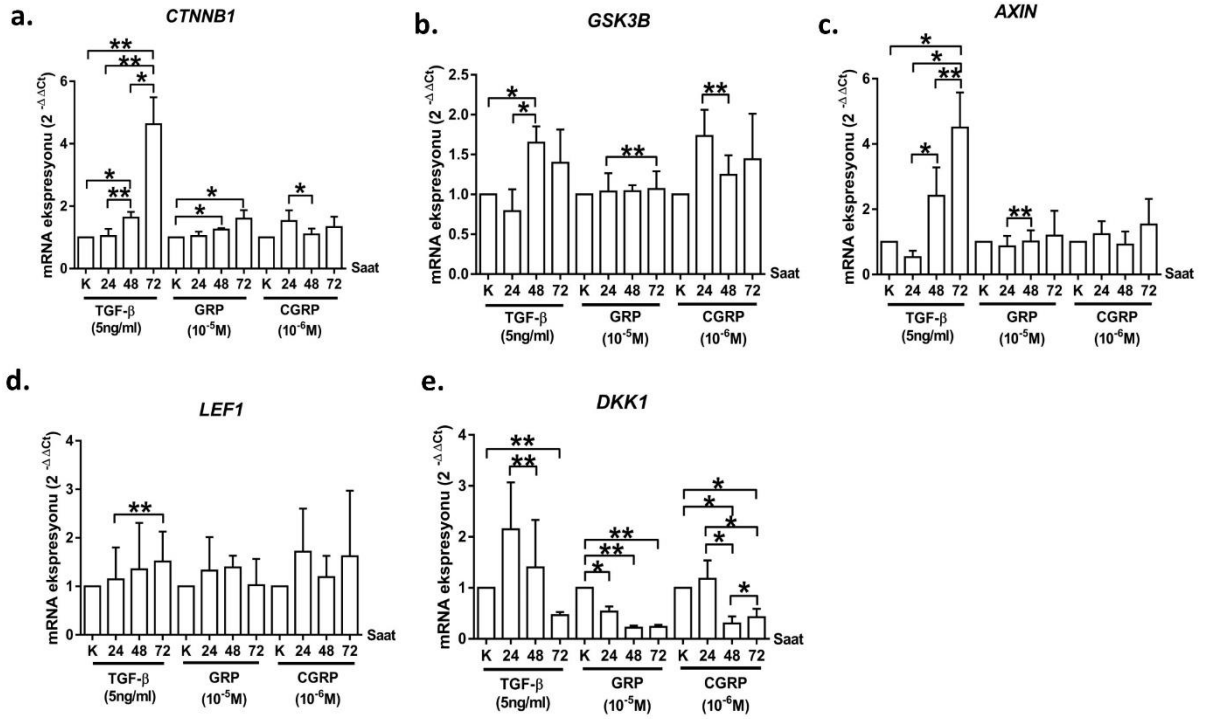
CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde uyarımı takip eden zaman dilimlerinde 48. saatte 0.saat ile karşılaştırıldığında *TGFBI* geninin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4.21). CGRP uyarımı *SMAD2* gen ekspresyonunu özellikle uyarımı takip eden 48. saatte arttırdığı belirlendi ($p<0,01$). Artış 72. saatte pik yapmaktaydı ($p<0,05$). *SMAD3* gen ekspresyonunun deneyin 24. saatinden itibaren (24. saat için $p<0,05$; 48. saat için $p<0,01$; 72. saat için $p<0,05$) CGRP tarafından uyarıldığı belirlendi. CGRP uygulaması *SMAD4* gen ekspresyonunu 0. saatle karşılaştırıldığında 24. ($p<0,05$) 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerde anlamlı düzeylerde artırdığı gözlemlendi. Bu ekspresyon profili TGF- β 'nın *SMAD4* gen seviyeleri üzerine etkisinden daha azdı. CGRP uygulaması *SMAD7* gen

ekspresyon seviyelerini 24. ($p<0,05$), 48. ($p<0,05$) ve deneyin 72. ($p<0,01$) saatinde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalttı. *SMAD7* gen ekspresyon seviyeleri üzerine CGRP'nin etkisi TGF- β 'ya ve GRP'ye göre daha güçlüdür ve benzer azalış profili göstermektedirler (Şekil 4.21).

4.4.3. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde Wnt Sinyal Yolağı İle İlişkili Genlere Ait Bulgular

GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *CTNNB1* gen ekspresyonu 48. saatte kontrole göre anlamlı düzeylerde arttı ($p<0,05$). Bu artış 72. saatte daha da artmaktaydı. ($p<0,05$). *CTNNB1* gen ekspresyonundaki bu değişim profili TGF- β 'nın etkisinden daha zayıftı. GRP uyarımı MRC5 hücrelerinde *GSK3B*, *AXIN1* ve *LEF1* genlerinin ekspresyonunu deneyin 0. saati ile karşılaştırıldığında deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde anlamlı ölçüde değiştirmede. GRP, *DKK1* gen ekspresyon seviyelerini deneyin 24. ($p<0,05$) saatinden itibaren deneyin 48. ($p<0,01$) ve 72. ($p<0,01$) saatlerinde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalttı. GRP, TGF- β 'nın *DKK1* geni üzerindeki etki profiline benzer profil göstermekle birlikte TGF- β 'dan ve CGRP'den daha güçlü etki göstermektedir (Şekil 4.22).

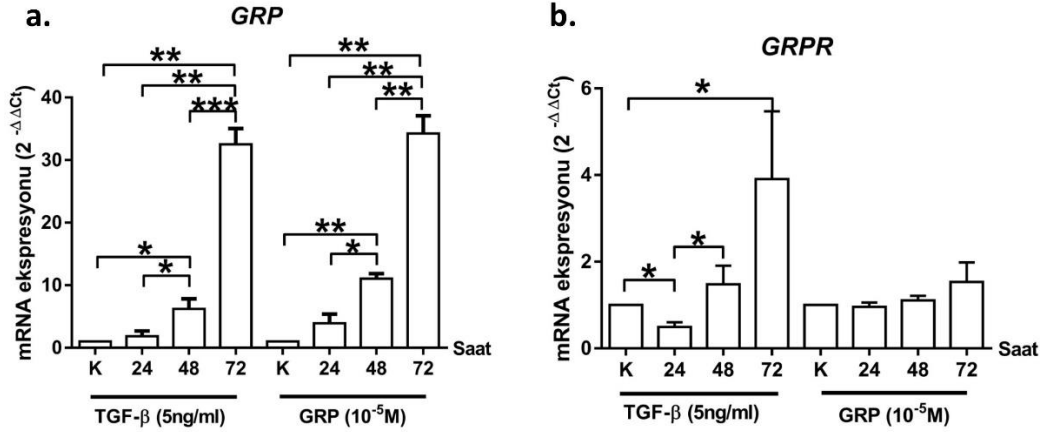
CGRP, MRC5 hücrelerinde *CTNNB1*, *GSK3B*, *AXIN1* ve *LEF1* genlerinin ekspresyonunu deneyin 0. saati ile karşılaştırıldığında deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde anlamlı ölçüde değiştirmede. *CTNNB1* ve *GSK3B* gen ekspresyonundaki bu değişim profili TGF- β 'nın etkisinden daha zayıftır. CGRP, *DKK1* gen ekspresyon seviyelerini 24. saatte biraz arttırdıktan sonra deneyin 48. ($p<0,05$) ve 72. ($p<0,05$) saatlerinde 0. saate göre istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalttı. CGRP, TGF- β 'nın *DKK1* geni üzerindeki etki profiline benzer profil göstermekle birlikte daha güçlü etki göstermektedir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: TGF-β (5ng/ml), GRP (10⁻⁵M) ve CGRP (10⁻⁶M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *CTNNB1* (a), *GSK3B* (b), *AXIN* (c), *LEF1* (d) ve *DKK1* (e) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler gösterilmektedir. **K:** Deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05 ve **p<0,01.

4.4.4. GRP ve CGRP ile Uyarılan MRC5 Hücrelerinde GRP, CGRP, Onların Reseptörleri ve G proteini Aracılı Hücre İçi Sinyal Moleküllerine Ait Gen Ekspresyon Bulguları

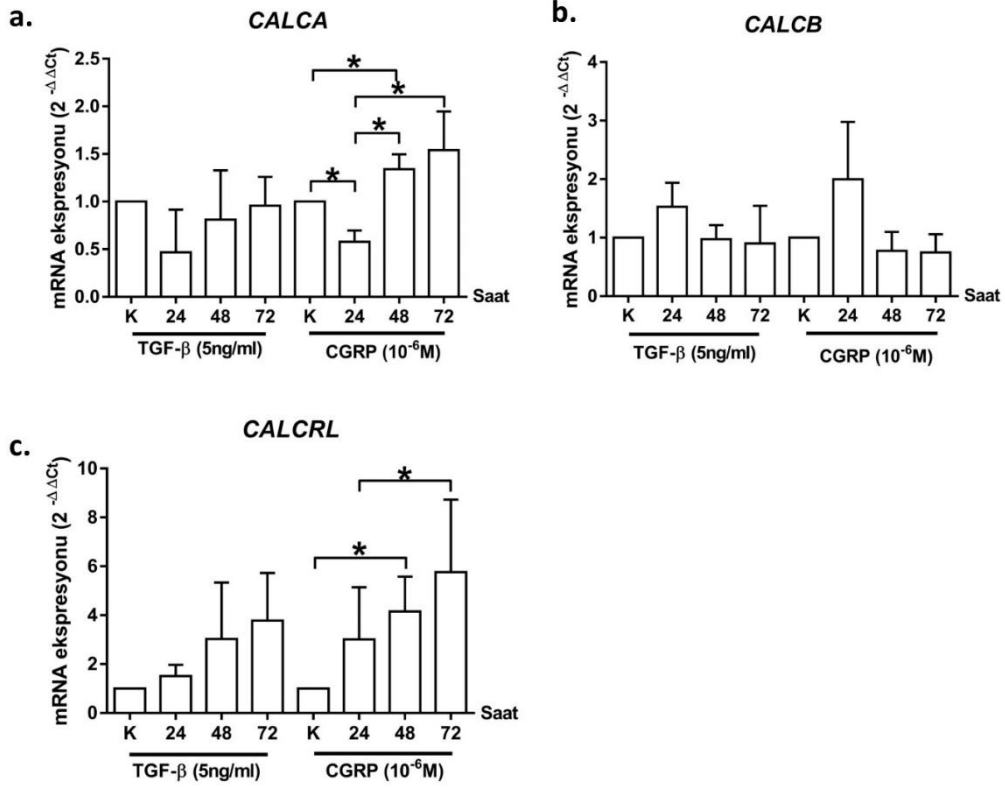
GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde GRP, kendi geninin ekspresyonunu deneyin 24. saatinden itibaren arttırmaya başladı, bu artış deneyin 48. (p<0,01) ve 72. (p<0,01) saatlerinde deneyin 0. saatine göre daha da arttı. GRP uygulaması, GRP gen ekspresyonunu uyarmasına rağmen, reseptör geni olan *GRPR* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 4.23 a-b). TGF-β, MRC5 hücrelerinde *GRP* gen ekspresyon seviyelerini zamana bağlı artış tarzında deneyin 48. (p<0,05) ve 72. (p<0,01) saatlerinde uyardı. TGF-β, *GRPR* gen ekspresyon seviyelerini ise ilk 24. saatte kontrole göre anlamlı düzeyde azalttı (p<0,05), 48. saatte artış yönünde etki etmeye başladı ve *GRP* gen ekspresyonunda 72. saatte 0. saate göre anlamlı bir artış gözlemlendi (p<0,05). (Şekil 4.23 a-b).



Şekil 4.23: TGF-β (5ng/ml) ve GRP (10⁻⁵M)'nin 24., 48. ve 72. saatlerde MRC5 insan akciğer fibroblast hücrelerinde (a.) *GRP* ve (b.) *GRPR* gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **K:** Deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001.

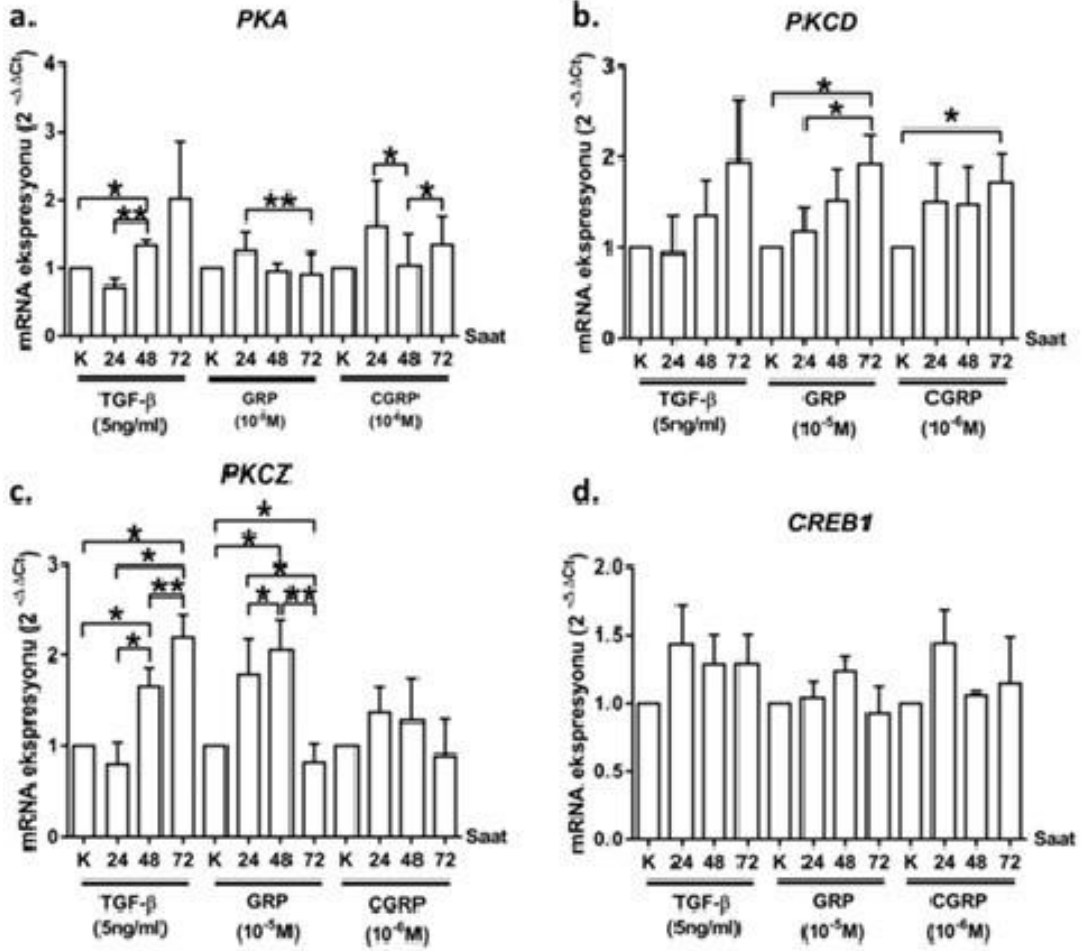
CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *CALCA* gen ekspresyonu 0. saate göre deneyin 24. saatinde azaldı (p<0,05), deneyin 48. ve 72. saatlerinde ise arttı; 48. saatteki bu artış (p<0,05) 0. saatle karşılaştırıldığında anlamlıydı. (Şekil 4.24 a). CGRP, *CALCB* gen ekspresyonu üzerinde deney süresince anlamlı bir değişiklik yapmadı (Şekil 4.24 b). CGRP, *CALCRL* reseptör gen ekspresyonunu 48.saatte 0.saate göre anlamlı düzeyde artırdı (p<0,05, Şekil 4.24 c). TGF-β, *CALCA*, *CALCB* ve *CALCRL* genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerinde etkili olmadı (Şekil 4.24 a-c).

GRP uygulamaları MRC5 hücrelerinde, protein kinaz C-delta (*PKCD*) ve protein kinaz C-zeta (*PKCZ*) genlerinin ekspresyonlarını etkilerken, protein kinaz A (*PKA*) ve *CREB1* gen ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadı (Şekil 4.25 a-d). GRP, *PKCD* gen ekspresyon seviyelerini deneyin 24. saatinden itibaren arttırmaya başlasa da deneyin 72. saatinde deneyin 0. saatine göre anlamlı bir artış meydana getirdiği görüldü (p<0,05). GRP, *PKCZ* gen ekspresyonu üzerinde TGF-β ve CGRP'den daha etkilidir. GRP uygulaması *PKCZ* gen ekspresyonunu 24. ve 48 (p<0,05). saatlerde 0. saate göre arttırırken, 72. saatte 0. (p<0,05), 24. (p<0,05) ve 48. (p<0,01) saate göre anlamlı düzeylerde azalttı. TGF-β, 48. ve 72 saatlerde kontrole ve diğer gruplara göre *PKCZ* gen ekspresyon seviyelerini arttırırken GRP ilk 48 saat benzer bir profil gösterirken 72. saatte azalan yönde farklı bir profil göstermektedir (Şekil 4.25 a-d). TGF-β, GRP ve CGRP *CREB1* gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde değiştirmede (Şekil 4.25 d).



Şekil 4.24: TGF-β (5ng/ml) ve CGRP (10⁻⁶M)'nin 24., 48. ve 72. saatlerde MRC5 insan akciğer fibroblast hücrelerinde (a.) *CALCA*, (b.) *CALCB* ve (c.) *CALCRL* gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **K:** Deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05.

CGRP uygulamaları MRC5 hücrelerinde, *PKA* ve *PKCZ* genlerinin ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmazken, deneyin 0. saatiyle karşılaştırıldığında *PKCD* gen ekspresyonunu 72. saatte anlamlı düzeylerde arttırdı (p<0,05; Şekil 4.25).



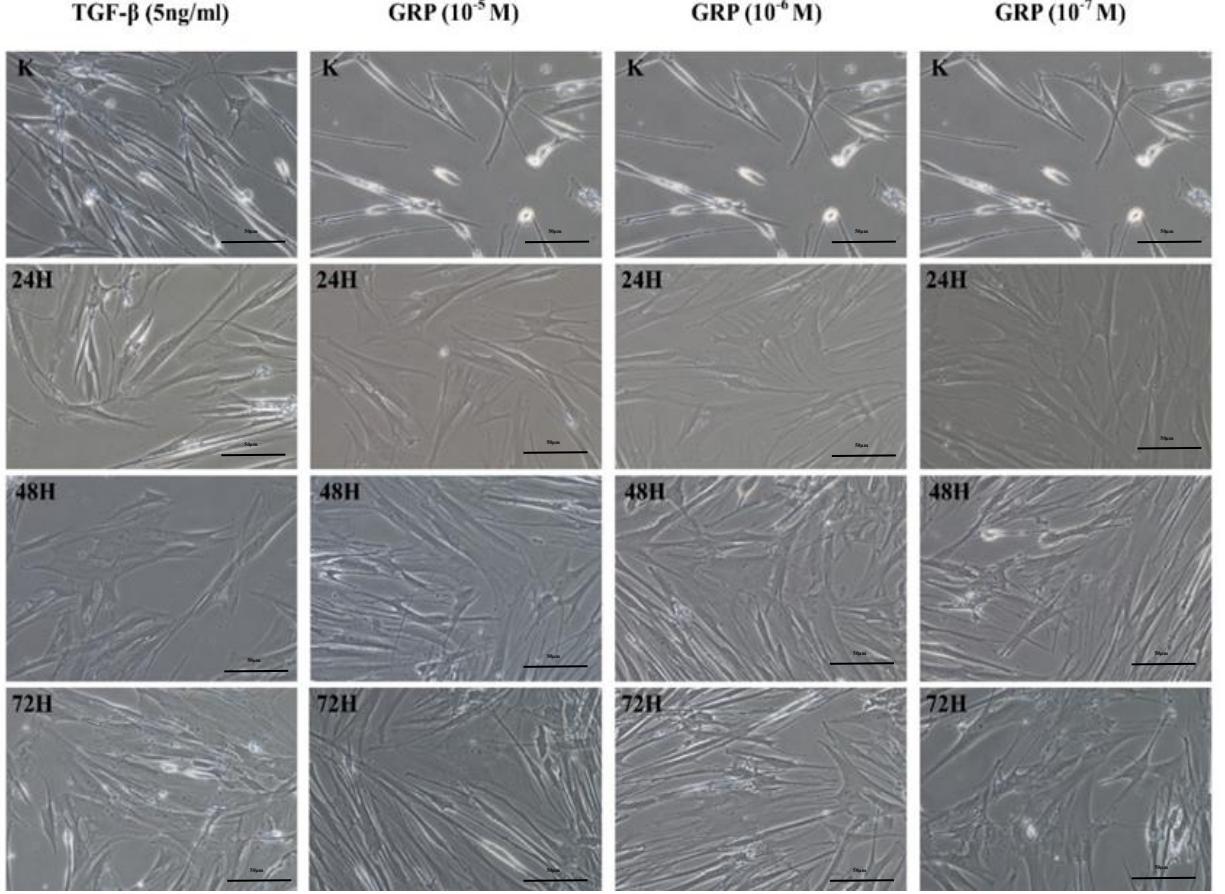
Şekil 4.25: TGF-β (5ng/ml), GRP (10⁻⁵M) ve CGRP (10⁻⁶M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *PKA* (a), *PKCD* (b), *PKCZ* (c) ve *CREB1* (d) genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimleri göstermektedir. K: deneyin 0. saati. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05 ve **p<0,01.

4.5. MİKROSKOPİ BULGULARI

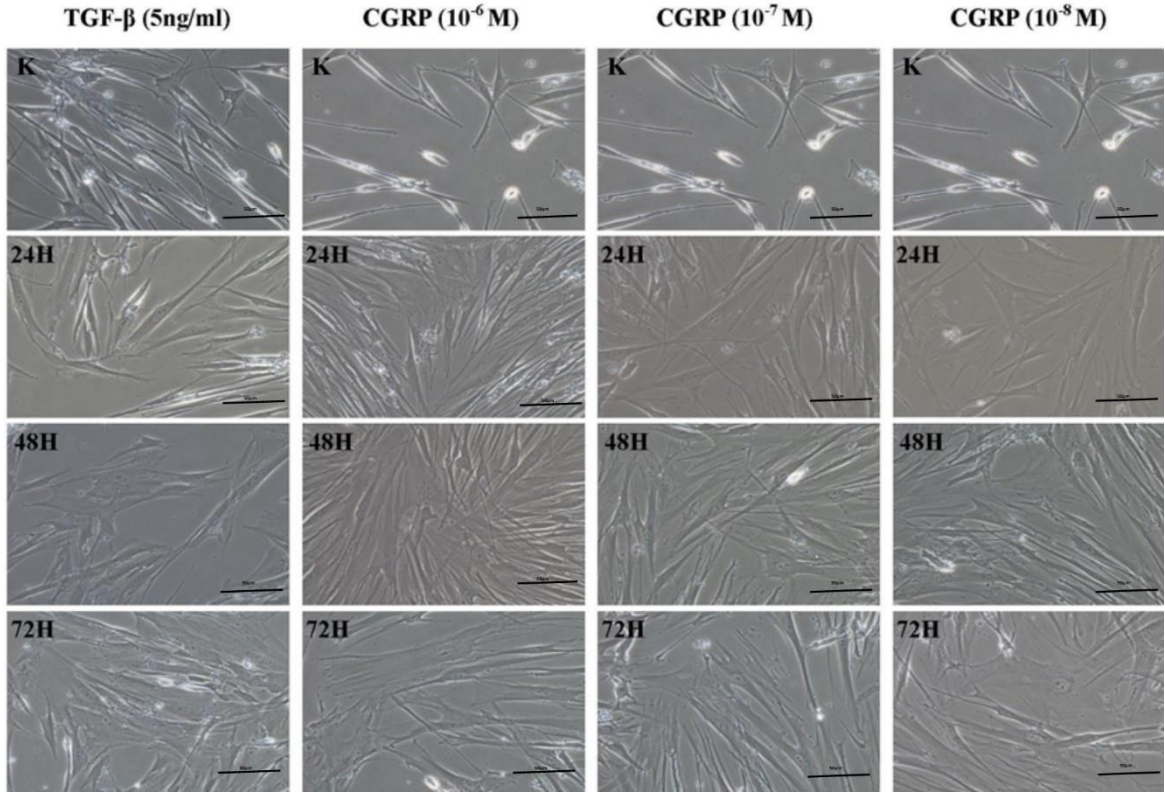
4.5.1. Faz-Kontrast Mikroskopu Bulguları

GRP ile uyarım öncesinde, deneyin 0. saatinde, MRC5 hücreleri birbirlerinden uzakta konumlanan ve ince sitoplazmik uzantıları olan mekik şeklinde hücreler olarak mikroskop altında ayırt edildiler. GRP'nin her üç dozu da (10⁻⁵, 10⁻⁶ ve 10⁻⁷M) bu hücrelerin morfolojilerinin değişmesine neden oldu (Şekil 4.26). GRP uyarımını takip eden süreçte hücreler, deneyin 24. saatinden itibaren deneyin 48. ve 72. saatlerinde, daha fazla sayıda ince-uzun sitoplazmik uzantıya ve daha geniş bir hücre gövdesine sahip hücreler olarak gözlemlendiler. Ayrıca, hücreler yığınlar oluşturacak şekilde birbirlerine daha yakın konumlandılar. Çeşitli

konsantrasyonlarda (10^{-6} , 10^{-7} ve 10^{-8} M) CGRP ve 5ng/ml TGF- β ile uyarılan MRC5 hücrelerinde de benzer morfolojik değişimler saptandı (Şekil 4.27).



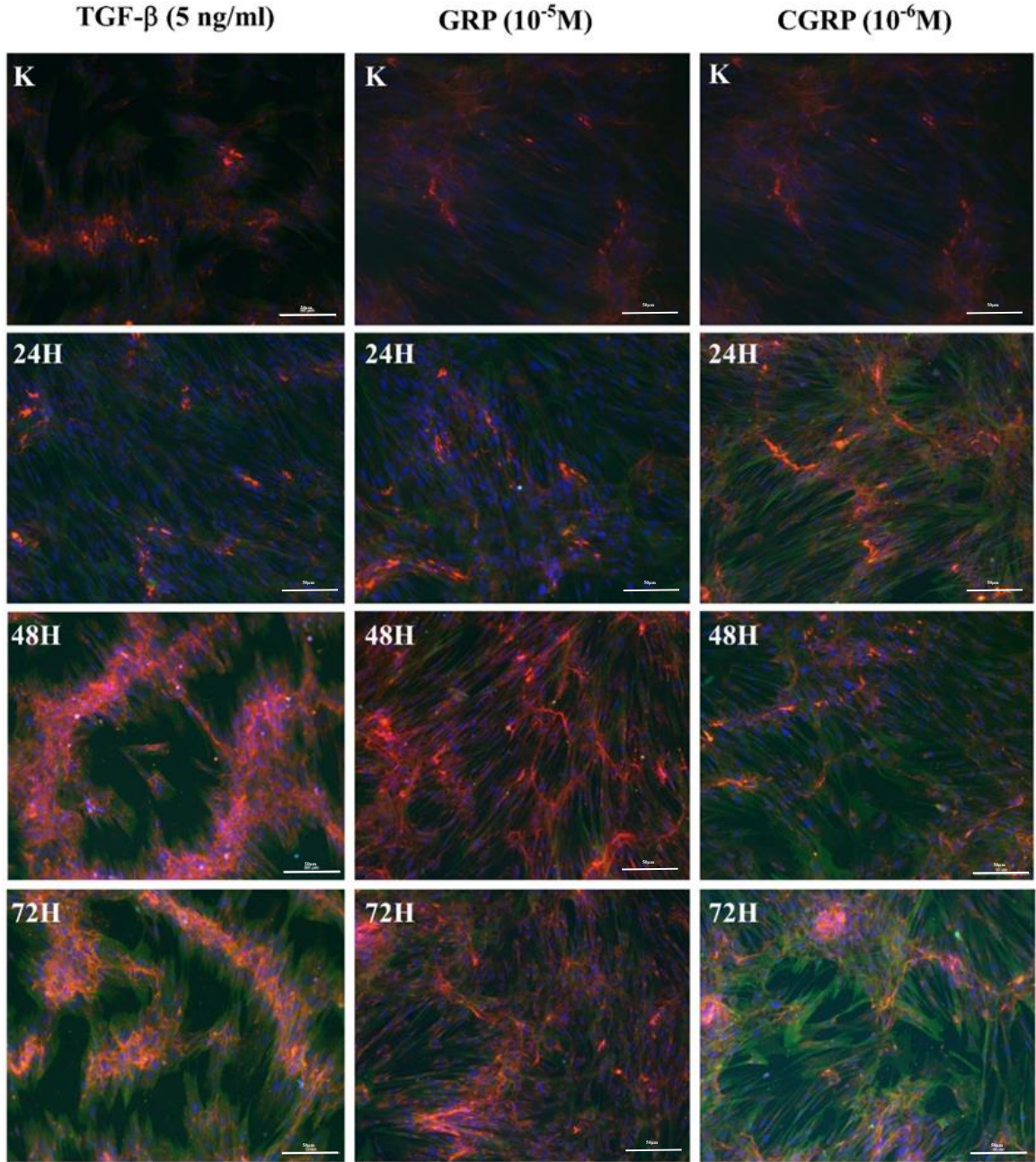
Şekil 4.26: TGF- β (5ng /ml) ve GRP (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} M) uyarımı takip eden süreçte MRC5 hücrelerinin morfolojilerinde değişikliğe sebep olur. Faz-kontrast mikroskobu, 40X büyütme. Bar: 50 μ m.



Şekil 4.27: TGF-β (5ng/ml) ve CGRP (10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ M) uyarımı takip eden süreçte MRC5 hücrelerinin morfolojilerinde değişikliğe sebep olur. Faz-kontrast mikroskobu, 40X büyütme. Bar: 50µm.

4.5.2. İkili İmmünfloresan İşaretleme Bulguları

Anti-α-SMA immunoreaktivitesi MRC5 hücrelerinin sitoplazmalarında gözlemlendi. GRP (10⁻⁵ M), CGRP (10⁻⁶ M) ve TGF-β (5 ng/ml) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde, uyarımı takip eden süreçte, deneyin 24. saatinden itibaren anti-α-SMA immunoreaktivitesinde bir artış tespit edildi. Bu artış, deneyin 48. ve 72. saatlerinde zamana bağlı olarak artarak devam etti (Şekil 4.28). Ayrıca, MRC5 hücrelerinin bu üç peptid ile uyarılmaları sonrasında, uyarımı takip eden 48. saatten itibaren anti-kollajen-1α1 immunoreaktivitesinde de bir artış belirlendi. Bu artış, deneyin 72. saatinde en yüksek seviyeye ulaştı (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: TGF- β (5ng/ml), GRP (10^{-5} M) ve CGRP (10^{-6} M) ile uyarılan MRC5 hücrelerinde **anti- α -SMA** ve **anti-kollajen-1 α 1** immünoreaktivitesindeki değişimler gösterilmiştir. Hücrelerin nükleusları **DAPI** ile işaretlenmiştir. 40X büyütme, Bar uzunluğu: 50 μ m.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, solunum hastalıkları yılda bir milyon kişinin ölümüne neden olmakta ve bu hastalıklar içinde İPF'in görülme sıklığı ve mortalite oranı hızla yükselmektedir. İPF mortalitesindeki artış, en fazla İngiltere, Finlandiya ve Portekiz'de rapor edilmiştir. Diğer yandan Danimarka, Hırvatistan ve Avusturya'da erkeklerde, Romanya'da ise kadınlarda mortalitede artış dikkati çekmektedir. Bu veriler, Avrupa ülkelerinin çoğunda İPF mortalitesinin erkeklerde kadınlara göre daha fazla yükseldiğini işaret etmektedir. Solunum hastalıklarında 5 yıllık sağ kalım oranlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, İPF'in %30 sağ kalım oranı ile akciğer kanserinden sonra en düşük 2. sağ kalım oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Raghu ve diğ., 2011; Amerikan Kanser Derneği, 2014). Ayrıca, İPF'in yumurtalık, kolorektal ve meme kanserlerinden ve pulmoner hipertansiyondan daha kötü bir sağ kalım oranı sergilediği bildirilmektedir (Amerikan Kanser Derneği, 2014). İPF görülme sıklığı, nüfus artışı ve hastalığın olası risk faktörlerinin artışıyla birlikte hızlanmaktadır. İPF prevalansı ve insidansı, Amerika Birleşik Devletleri'nde her 100.000 kişide sırasıyla 14-27,9 ve 6,8-8,8 olgu iken (Raghu ve diğ., 2006), Avrupa'da her 100.000 kişide 1,25-23,4 ve 0,22-7,4 olgudur (Navaratnam ve diğ., 2011; Nalysnyk ve diğ., 2012). Nüfus artışı temel alınarak yapılan hesaplamalarda, 2015-2050 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde İPF insidansının 1,8 kat artacağı tahmin edilmektedir (Fernández-Pérez ve diğ., 2010). Ülkemizde ise İPF prevalansı ve insidansı ile ilgili ilk veriler, 2014 yılında Türkiye'nin 6 bölgesinden 19 şehirdeki 31 merkezin katılımıyla 2245 hastanın yer aldığı çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmada İPF prevalansının ve insidansının arttığı bildirilirken, Türkiye'de interstisyel akciğer hastalıklarının insidansının 100,000'de 25,8 olduğu saptanmıştır. Ülkemizde İPF'li hastaların insidansının ise interstisyel akciğer hastalıklarının %25'i kadar olduğu belirlenmiştir (Musellim ve diğ., 2014). İPF prevalansı, insidansı ve mortalite oranları dikkate alındığında, İPF'in, ülkemizde ve dünyada prevalansı gün geçtikte artan ölümcül bir interstisyel akciğer hastalığı olduğu açıkça görülmektedir. Bu nedenle, pulmoner patogenezi anlamaya ve yeni terapötik ajan bulmaya yönelik çalışmalar, hız kaybetmeden sürmektedir. Pulmoner fibrozis ile ilişkili ilk yayın 1923'de yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda her yıl çok sayıda konu ile ilgili makale yayınlanmıştır. PubMed'de yaptığımız tarama sonuçlarına göre, sadece 2018 yılında 3,000'den fazla konuyla ilgili makale bulunmaktadır. Pulmoner fibrozis ile ilgili çalışmaların birçoğunda çok sayıda ilaç öncül molekül denemeleri yapılmasına rağmen, faz 4 çalışmalarını geçen sadece iki molekül bulunmaktadır. Nintedanib ve pirfenidon isimli bu iki ilaç, günümüzde İPF

tedavisinde kontrollü olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçları kullanan bazı hastalarda solunum fonksiyonlarında iyileşmeler tespit edilmiş olmasına rağmen bu iki ilaç tüm İPF'li hastalarda terapötik etki göstermeyebilmektedir. Ayrıca etkili oldukları hastalarda da çeşitli yan etkiler oluşturabilmektedirler (Sgalla ve diğ., 2018). Dolayısı ile günümüzde İPF'te kesin etkili bir terapötüğün bulunamaması, hastalığa neden olan halen keşfedilmemiş yeni moleküller olduğunu açıkça göstermektedir. Çalışmamız, GRP ve CGRP peptidlerinin pulmoner fibrozis patogenezinde etkili moleküller olduğuna, bu peptidlerin özellikle TGF- β ve Wnt sinyallerini uyararak insan akciğer fibroblastlarının miyofibroblastlara farklılaşmasını sağladığına ve miyofibroblastlarda kollajen, fibronektin gibi ECM elemanlarının sentezini arttırdığına yönelik yeni veriler sunmaktadır.

Pulmoner fibrozis, tekrarlı yaralanma ve onarım süreçlerinin geri dönüşümsüz yapısal değişikliklere ve doku sertleşmesine yol açtığı, kronik ve ilerleyici tipte bir akciğer hastalığıdır. Metotreksat ve bleomisin gibi ilaçlar, silika ve asbest maruziyetleri, gastro-özofageyal reflü ve infeksiyöz ajanlar alveolar epitel hasarına neden olurlar ve hasar bölgesinde inflamasyon gelişir (Jacubovic ve diğ., 2013; Yılmaz ve diğ., 2015; Chioma ve Drake, 2017). Epitel ve mezenşim hücrelerinden salınan TGF- β gibi inflamatuvar ajanlar ile çeşitli büyüme faktörleri ve Wnt ligandları, fibroblast aktivasyonunu ve miyofibroblast farklılaşmasını düzenlerler. Dokuda sayıca artan fibroblast ve miyofibroblastlar, aşırı miktarda ECM elemanlarını üretilen hücre dışına salgılayarak fibrotik odakları oluştururlar (King ve diğ., 2011; Wolters ve diğ., 2014). Fibroblast aktivasyonun ilk adımında fibroblastlar bölünerek sayılarını arttırırlar, ikinci adımında ise fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşması gerçekleşir. Fibrotik akciğerlerde, fibrotik odaklarda fibroblast birikimi görülür. Yılmaz ve diğ. (2015), bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan farelerin akciğerlerinde fibrotik odaklarda Ki-67⁺ (proliferasyon belirteci) hücrelerin sayıca arttığını, ayrıca bu alanlarda fibroblast spesifik protein ile işaretlenen fibroblast sayısında da artışlar gözlemlemişlerdir. İPF'li hastaların fibroblastlarının sağlıklı akciğer fibroblastlarına göre daha yüksek çoğalma kapasitesine sahip olduğu bilinmektedir (Ramos ve diğ., 2001). İPF'li hastalardan izole edilen fibroblastlarda, PI3K-Akt sinyali aracılığı ile fibroblast proliferasyonunun uyarıldığı bulunmuştur (Xia ve diğ., 2008). Fibrotik insan akciğerlerinde artan Wnt5a ekspresyonunun fibroblast proliferasyonunu uyardığı saptanmıştır (Vuga ve diğ., 2009). GRP ve CGRP peptidleri, insan akciğerlerinde solunum yollarının iç yüzünü döşeyen epitel içinde bulunan PNEC'ler tarafından üretilirler. Yeni doğan C57BL/6

farelerde yapılan bir çalışmada, yeni doğanlara postnatal 1-3. günlerde yapılan bombesin/GRP uygulamasını takip eden 14. günün sonunda kalınlaşan alveolar duvarda hücre proliferasyonunun uyarıldığı ve farelerde bronkodisplazi geliştiği bulunmuştur (Ashour ve diğ., 2006). Sıçan akciğerlerinden izole edilen primer fibroblastlar, TGF- β ile uyarılmalarından 1 saat önce CGRP peptidi (1, 10, 100 nM/L) ile uyarıldıklarında, TGF- β ile uyarılan fibroblast çoğalmasının 24. saatin sonunda CGRP tarafından azaltıldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, CGRP peptidinin bu etkisinin doza bağımlı olduğunu, düşük konstrasyonlarda daha güçlü etki gösterdiğini saptadılar (Li ve diğ., 2016). BrdU yöntemi S fazındaki hücrelerin BrdU ile etiketlenmesi esasına dayanır. BrdU miktarındaki artış S fazındaki çoğalan hücrelerin sayısındaki artışla koreledir (Muir ve diğ., 1990). Buna göre, çalışmamızın verileri, GRP ve CGRP'nin insan akciğer fibroblastlarının proliferasyonunu uyarımda etkili olabileceğini ilk kez ortaya koymaktadır. Her iki peptid de erken dönemde (uyarımı takip eden ilk 24 saatte) akciğer fibroblastlarının proliferasyonunu uyarırken, zaman ilerledikçe deneyin 48. ve 72. saatlerinde hücre proliferasyonunu azaltma yönünde etki göstermektedirler. Bu sonuçlar, her iki peptidin doza ve zamana bağlı olarak fibroblast proliferasyonunu uyararak, özellikle erken dönemde, pulmoner fibrozise katkı sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.

Akciğer fibroblastlarının ve hasar gören alveolar epitelde tip 2 pnömositlerin miyofibroblastlara farklılaşması, akciğer fibrozisinin gelişiminde özellikle İPF patogenezinde en önemli adımlardan biridir. Miyofibroblastlar, α -SMA sentez ederler ve kollajen, laminin ve fibronektin gibi ECM elemanlarını çok miktarda üretebilirler (Saito ve diğ., 2018). Endotel hücreleri, epitel hücreleri, tip 2 pnömositler, fibrositler, fibroblastlar, perisitler ve mezenkimal kök hücreleri farklılaşarak miyofibroblastlara dönüşebilirler (Gharaee-Kermani ve diğ., 2009; Phan, 2012). TGF- β , miyofibroblast farklılaşmasının uyarılmasında görev alan en güçlü moleküllerden biridir, bu nedenle profibrotik bir molekül olarak kabul edilmektedir. Fibrotik akciğerlerde TGF- β üretiminde ve aktivasyonunda artış rapor edilmiştir (Khalil ve diğ., 1996; Leppäranta ve diğ., 2012). Pulmoner fibroziste alveolar makrofajlar ve metaplastik tip 2 pnömositler, TGF- β üretilen salgırlar (Coker ve diğ., 2001). TGF- β , ECM elemanlarının üretimini, integrinleri, MMP'leri, proteaz inhibitörlerini ve küçük GTPaz düzenleyicilerini uyarır ve fibrotik alandaki doku remodellemesinde görev alır (Yang ve diğ., 2007; Heldin ve Moustakas, 2016). Ayrıca, TGF- β 'nin hepatosit büyüme faktörü ve prostoglandin E2 gibi anti-fibrotik moleküllerin üretimini baskılayarak da akciğer fibrozisini uyardığı rapor edilmiştir (Garison ve diğ., 2013).

TGF- β , akciğerde hem fibroblastların hem de tip 2 pnömositlerin miyofibroblastlara farklılaşmasını uyarır. A549 hücreleri, tip 2 pnömositlerin bazı özelliklerini taşıdıklarından, bu hücrelerin mezenkimal hücrelere/miyofibroblastlara farklılaşmalarının araştırıldığı çalışmalarda sıkça kullanılırlar (Park ve diğ., 2018). A549 hücreleri TGF- β ile uyarıldıklarında, hücrelerde E-kaderin gen ekspresyonunu azalttıkları, Snail, Slug, N-kaderin, vimentin, fibronektin ve kollajen-1 α 1 ekspresyonları arttırdıkları belirlenmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar, TGF- β ile uyarılan MRC5 hücrelerinde α -SMA, fibronektin ve kollajen-1 α 1'in gen ve protein ekspresyonlarının arttığını tespit etmişlerdir (Omori ve diğ., 2016). Bir başka *in vitro* çalışmada da A549 hücreleri ve akciğer fibroblast hücrelerinin birlikte kültüre edildiği çalışmada, 24 saat kadar 5ng/ml TGF- β uygulamasının fibroblastların ve A549 hücrelerinin miyofibroblastlara dönüşümünü uyardığı saptanmıştır (Liu ve diğ., 2010). Çalışmamızda GRP ve CGRP'nin fibrotik etkilerini test etmek için güçlü bir profibrotik ajan olan TGF- β pozitif kontrol olarak kullanıldı. TGF- β ile uyarılan A549 ve MRC5 hücrelerinde, diğer çalışmaların sonuçları ile uyumlu olarak, A549 hücrelerinde EMT'nin uyarıldığı, bu hücrelerin miyofibroblastlara farklılaştıkları saptandı. A549 hücreleri, TGF- β ile uyarımını takip eden 24. saatten itibaren deneyin 72. saatine kadar olan dönemde zamanla E-kaderin protein miktarlarını azaltmakta, α -SMA protein miktarlarını ise zaman ilerledikçe arttırmaktadırlar. Ayrıca, TGF- β literatürdeki verilere uyumlu bir şekilde fibroblastların-miyofibroblastlara farklılaşmasını sağlamaktadır.

İlk olarak 1983 yılında, normal ve hasta fetal ve erişkin insan akciğer dokularında yapılan immunohistokimyasal işaretlemeler sonrasında, fibrotik akciğerlerin bronşiyollerinde hiperplastik odaklarda GRP'nin varlığı saptanmıştır (Tsutsumi ve diğ., 1983). Sıçanlara lipopolisakkarit uygulamasından 3-6 hafta sonra, inflamasyonlu ve fibrotik sıçan akciğerlerinden alınan BAL sıvısında alveolar makrofajlardan bombesin benzeri peptid salınımının arttığı belirlenmiştir (Lemaire ve diğ., 1991). Diğer bir çalışmada, yeni doğan C57BL/6 farelerde postnatal dönemin ilk 3 gününde yapılan bombesin/GRP uygulamalarının, postnatal dönemin 14. gününde fare akciğerlerinde α -SMA immunoreaktivitesini arttırdığı, alveolar duvar kalınlığında belirgin bir artışa neden olduğu ve alveolarizasyonu azalttığı tesbit edilmiştir. Aynı çalışmada *GRPR* geni çıkarılan farelerde, GRP'nin tüm bu etkilerinin kaybolduğu belirlenmiştir (Ashour ve diğ., 2006). GRP molekülünün akciğerde fibrotik etkilerini gösteren bir başka çalışma C57BL/6 fareler üzerinde yapılmıştır. Bu çalışmada, 15

Gy yüksek doz torasik radyasyon uygulamasından sonraki 20. haftada pulmoner fibrozisin meydana geldiği görülmüştür. Fare akciğerlerinde, radyasyon maruziyetini takip eden 4. haftada interstisyel CD68⁺ makrofaj sayısında artış, 6. haftada PNEC'lerde hiperplazi, 10 hafta sonra nükleer p-Smad2/3 immünreaktivitesinde anlamlı bir artış ve 20. haftada α -SMA immunoreaktivitesi ve kollajen birikiminde belirgin bir artış tespit edilmiştir. GRP antagonisti olan 77427 kodlu molekül, radyasyon maruziyetinden 1 saat sonra ve 20. haftaya kadar haftada 2 defa C57BL/6 farelere verildiğinde, CD68⁺ makrofajlar, GRP içeren PNEC ve p-Smad2/3⁺ hücre sayılarında, α -SMA immünreaktivitesinde ve kollajen birikiminde azalma belirlenmiştir (Zhou ve diğ., 2013). Ancak, bu çalışmada GRP'nin pulmoner fibrozis patogeneğinde etkili olabileceği gösterilmiş olmasına rağmen, bu süreçte GRP'nin fibrotik yanıt oluşturmada etkili olduğu hedef hücreler ve sinyal yolları araştırılmamıştır. Çalışmamız, 10⁻⁵ M GRP dozunun MRC5 fibroblast hücre hatlarında deneyin 48. ve özellikle 72. saat dilimlerinde α -SMA protein ve gen ekspresyonunu arttırarak miyofibroblast farklılaşmasını uyardığını göstermektedir. Miyofibroblast hücreleri, fibroblast hücrelerinden daha fazla miktarda kollajen ve fibronektin gibi ECM elemanlarını üretilirler. Bu durum çalışmamızın immünfloresan, Western emdirim ve gen ekspresyon verileriyle de desteklenmektedir. GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde kollajen gen ve protein ekspresyonu ile fibronektin protein miktarı uyarımı takip eden zaman diliminde deneyin 48. saatinden itibaren artmaktadır. Çalışmamızda GRP'nin insan akciğer fibroblastları üzerindeki direkt etkisi ilk kez test edilmiştir. Çalışmamızın sonuçları, insan akciğer fibroblastlarının GRP'nin hedef hücreleri olduğunu ve GRP'nin, MRC5 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşması yanısıra bu hücrelerde kollajen ve fibronektin sentezini uyarma yönünde etkili olduğunu açıkça göstermektedir. CGRP, duysal sinirler ve PNEC'ler tarafından salgılanan majör biyoaktif peptidlerden biridir; akciğer gelişimi ve hasar onarımı için gerekli olan havayolu epitel kök hücrelerinin fonksiyonlarında ve alerjenlere karşı havayolu hassasiyetinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (Liu ve diğ., 2006; Sui ve diğ., 2018). Bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan FVB/NJ farelerde bleomisin uygulamasından iki hafta sonra tüm akciğerin seri kesitleri incelendiğinde, CGRP⁺ PNEC sayısında kontrol grubuna göre bleomisinli grupta 3 kat artış olduğu saptanmıştır. Bu gözlemler sonucunda, araştırmacılar, sayıca artan CGRP içeren PNEC'lerin pulmoner fibrozis patogeneğinde önemli rolleri olabileceği değerlendirmesinde bulunmuşlardır (Liu ve diğ., 2014). CGRP'nin pulmoner fibrozis patogeneğinde etkili olabileceğini gösteren ilk deneysel veri fibrotik sıçan akciğerinden elde edilmiştir. Bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan sıçanlarda, bleomisin uygulamasından önce CGRP salınımını uyaran bir molekül olan

kapsaisin hayvanlara verilmesi, CGRP miktarının akciğerde artmasına ve akciğerde daha yaygın bir fibrozis görülmesine neden olmuştur (Li ve diğ., 2016). Ancak CGRP'nin fibrotik etkili olmadığını gösteren bir çalışmada literatürde mevcuttur. Bu çalışma endotelin dönüştürücü enzim-1 heterozigot fareler üzerinde yapılmıştır. Pulmoner fibrozisin uyarılmasında etkili moleküllerden olan endotelin-1, endotel hücrelerinde endotelin dönüştürücü enzim-1 tarafından üretilir. Endotelin dönüştürücü enzim-1 heterozigot farelere intratrakeal bleomisin uygulaması sonrasında kontrol farelere kıyasla akciğerde inflamasyonun ve fibrozisin azaldığı, akciğerde CGRP konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, CGRP sinyalleme heterozigot farelerde, inflamasyondan fibroze geçişi azalttığını ileri sürmektedirler (Hartopo ve diğ., 2013). Çalışmamızın verileri, CGRP'nin insan akciğer fibroblastlarını etkileyerek pulmoner fibrozisde etkili olabileceğine dair direkt kanıtları ilk kez sunmaktadır: CGRP, GRP gibi MRC5 fibroblastlarında α -SMA protein ve gen ekspresyonunu artırarak miyofibroblast farklılaşmasını ve hücrelerde kollajen (hem mRNA hem de protein) ve fibronektin (protein) sentezini uyarır. GRP ve CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerindeki α -SMA ve fibronektin protein miktarlarındaki artışlar, TGF- β ile uyarım sonrasında görülen α -SMA ve fibronektin protein miktarlarındaki artışlardan daha azdır. Bu durum, her iki peptidin de TGF- β kadar güçlü olmasa da insan akciğer fibroblastlarının miyofibroblastlara farklılaşmasını ve bu hücrelerde kollajen ve fibronektin gibi ECM elemanlarının üretimini uyarılabildiklerini açıkça göstermektedir. Bir hücre farklılaşacağı zaman bölünmesini durdurur ve farklılaşmaya yönelir. Çalışmamızda GRP ve CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde, uyarımı takip eden 48. ve 72. saatlerde hücrelerin bölünmelerini deneyin 0. ve 24. saatine göre anlamlı ölçüde azalttıkları belirlenmiştir. Hücreler, aynı zaman diliminde, bölünmelerini azalttıkları dönemde, α -SMA yanısıra kollajen ve fibronektin miktarlarını da arttırmaktadırlar. Bu bulgulara dayanarak, her iki peptidin de uyarımı takip eden erken dönemde MRC5 fibroblastlarının çoğalmasını uyarabileceklerini, ancak daha sonraki dönemde bu hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını uyararak kollajen ve fibronektin gibi ECM elemanlarının üretilmelerini sağladıklarını söyleyebiliriz.

Günümüzde pulmoner fibrozisin tedavisinde, EMT sürecinin geriletilmesi yolu ile miyofibroblast farklılaşmasının önüne geçilmeye veya azaltılmaya çalışılması önemli terapötik yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir. EMT, alveolar epitel hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasını sağlayarak, miyofibroblast sayısının ve bu hücreler tarafından ECM üretiminin artmasına neden olur. Böylece pulmoner fibrozis sürecine katkıda

bulunulur. Epitel hücreleri hasar sonucu oluşan mikroçevrede pro-fibrotik veya mitojenik uyarım sürecine yanıt olarak farklılaşmaya ya da proliferasyona yönlenebilir. İPF'li hastaların interstisiyumunda zayıf reaksiyon veren pro-SPC ve N-kaderin immunreaktif hücelere rastlanmıştır (Kim ve diğ., 2006). Ayrıca, İPF'li hastaların akciğerlerindeki fibrotik alanlardan izole edilen epitel hücrelerinde α -SMA, kollajen ve kalponin1 gibi mezenkimal hücre proteinlerinin ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir (Marmai ve diğ., 2011). A549 hücrelerinde, 4 gün boyunca 20 μ g/ml bleomisin uygulaması TGF- β /Smad3 sinyal yolunu uyararak A549 hücrelerinde E-kaderin ekspresyonunu azaltmış, α -SMA ve vimentin ekspresyonlarını ise arttırmıştır. A549 hücrelerinde EMT uyarılarak, epitel hücreleri miyofibroblastlara farklılaşmışlardır (Chen ve diğ., 2017). Ayrıca TGF- β ile uyarılan A549 hücrelerinin, E-kaderin, sitokeratin ve zonula okludens-1 gibi epiteliyal hücre belirteçleri yerine vimentin, dezmin, N-kaderin, α -SMA, fibronektin ve kollajen gibi mezenkimal hücre proteinlerini üretmeye başladıkları diğer bir ifadeyle epitel fenotiplerini mezenkimal fenotiplere dönüştürdükleri pek çok çalışma ile de gösterilmiştir (Kasai ve diğ., 2005; Kim ve diğ., 2006; Li ve diğ., 2016). Çalışmamızda TGF- β 'nin 5ng/ml dozunun A549 hücrelerinde α -SMA ekspresyonunu arttırdığı ve E-kaderin ekspresyonunu azalttığı saptandı. Ancak, GRP ve CGRP ile uyarılan A549 hücrelerinde α -SMA ekspresyonunun artmadığı ve E-kaderin protein seviyelerinin azalmadığı, hücre proliferasyonunun ise uyarıldığı çalışmamızda gözlemlenmiştir. GRP ve CGRP, fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını sağlarken, A549 hücrelerinde EMT'yi uyaramadığı için A549 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmalarını sağlayamamıştır. Dolayısı ile akciğerde fibrotik yanıtın oluşturulmasında alveolar epitelin bu iki peptid için hedef olmadığını düşünmekteyiz. Bu iki peptid A549 hücrelerinin proliferasyonunu uyarmaktadırlar. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda GRP'nin alveolar epitel hücrelerinin çoğalması üzerinde etkili olmadığı, CGRP'nin ise alveolar epitel hücre proliferasyonunu uyarabileceği gösterilmiştir. Jaeger ve diğ. (2017), GRP (50 ve 100 nM) uygulamasından 24 saat sonra bu peptidin A549 hücrelerinde proliferatif etki göstermediğini, ancak bu hücrelerde ROS üretimini ve hücre göçünü uyardığını bildirmişlerdir. GRP uygulamasının A549 hücreleri üzerinde proliferatif etkili olduğu ilk kez çalışmamızla gösterilmiştir. Kawanami ve diğ., (2009), 10⁻¹⁰ M konsantrasyonda CGRP- β ile uyarılan A549 hücrelerinde 0-36. saatler arasında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda bu peptidin hücrelerin proliferasyonunu uyardığını ve CGRPR inhibitörü uygulandığında ise proliferasyonun azaldığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız CGRP- α uygulamasının da A549 hücre proliferasyonunu uyardığı ortaya çıkarılmıştır. Bu durumda her iki CGRP formunun da

A549 hücrelerinde proliferasyonu uyarma yönünde etkili oldukları görülmektedir. Bu verilere dayanarak, GRP ve CGRP'nin A549 hücrelerinde proliferasyonu uyardıklarını, bu nedenle de bu hücrelerin EMT aracılığı ile miyofibroblast farklılaşmasına yönelemediklerini düşünmekteyiz.

GRP ve CGRP'nin MRC5 fibroblast hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasını uyardığı yukarıdaki paragraflarda tartışıldı. Ancak cevaplanması gereken önemli bir soru, “bu peptidlerin miyofibroblast farklılaşmasını nasıl uyardıkları” sorusudur. Bu amaçla, öncelikli olarak, miyofibroblast farklılaşmasında etkili sinyal yollarından biri olan Smad bağımlı TGF- β sinyali üzerinde GRP ve CGRP'nin etkileri araştırılmış, bu peptidlerin Smad bağımlı TGF- β sinyalini uyarıp uyardıkları test edilmiştir. Kemirgen akciğerlerinde gen transferi aracılığı ile aktif TGF- β 1'in geçici aşırı ekspresyonu gerçekleştirildiğinde, vektör uygulanmasından sonraki birkaç gün içinde endojen olarak aktif TGF- β 1 ekspresyonu artarken, herhangi bir inflamasyon gerçekleşmeksizin pulmoner fibrozis oluşmaktadır ve doku remodellenmesi meydana gelmektedir. Üstelik, fibroblastik odak oluşumu ve miyofibroblast farklılaşması da gerçekleşmektedir (Sime ve diğ., 1997). TGF- β sinyali inhibe edilen fareler, pulmoner fibrozise karşı korunabilmektedir (Warburton ve diğ., 2013). TGF- β , kollajen ve fibronektin gibi ECM elemanlarının üretimini uyararak ve MMP'ler ile onları düzenleyen proteinlerin aktivitelerini kontrol ederek ECM devinimini kontrol eder (Ovet ve Oztay, 2014; Oruçaj ve diğ., 2015). TGF- β sinyalinin pulmoner fibrozis patogenezinin en önemli katkısı, miyofibroblast farklılaşması uyarmasıdır. Akciğerlerde artan TGF- β 1 sinyal aktivasyonu, başta fibroblastlar, fibrositler ve tip 2 pnömositler olmak üzere çeşitli tipteki hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını sağlar (Fernandez ve Eickelberg, 2012; Li ve diğ., 2016). Normal erişkin akciğerlerin tersine, İPF'li akciğer dokusunda TGF- β 1 ekspresyonunda artış vardır (Khalil ve diğ., 1996). Smad bağımlı TGF- β 1 sinyalinin aktivasyonu, dokuda/hücrede artan Smad2/3 ve Smad4 gibi gen ve protein miktarının ve Smad2/3 aktivasyonunun artması, inhibitör protein olan Smad7 gen ve protein miktarının azalması ile anlaşılır (Kayalar ve Oztay, 2014). Smad3, aktive edilmiş TGFRII kompleksinin protein serin/tirozin kinazı için doğrudan bir substrattır. TGFRII'nin reseptörlerinin kinaz aktivitesi ile fosforillenen Smad3, Smad4'e bağlanarak nükleusa taşınır ve diğer transkripsiyonel proteinlerle birlikte spesifik gen promotörlerine bağlanır. Böylece TGF- β 'ya cevap veren genlerin transkripsiyonunu aktive eder. İnsan deri fibroblastlarında kollajen-1 genlerinin ekspresyonunun TGF- β tarafından uyarılabilmesi için Smad3'ün transkripsiyonel kompleks aktivasyonunun gerekli olduğu bulunmuştur (Ghosh ve diğ., 2000).

Bleomisin ile muamele edilen farelerin fibrotik akciğerlerinde ve TGF- β ile uyarılan fare fibroblastlarında p-Smad3 miktarında artış belirlenmiştir (Li ve diğ., 2006). İntratrakeal yoldan bleomisin verilen mutant farelerde Smad3 kaybı, TGF- β tarafından uyarılan prokollajen-1 mRNA ekspresyonunun ve akciğerde hidroksiprolin miktarının düşmesi ile sonuçlanmıştır (Zhao ve diğ., 2002). Fibrotik fare akciğerlerinden izole edilen primer fibroblast hücrelerinde α B-kristalin aracılı Smad4 proteinin nuklear lokalizasyonun uyarılması, bu hücrelerde TGF- β 1'in hedef genlerinden α -SMA ve prokollajen-1 genlerinin ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır (Bellaye ve diğ., 2014). Bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan farelerde, adenovirüs transfeksiyonu aracılığıyla Smad7 (TGF- β sinyal yolu inhibitör proteini) ekspresyonunun uyarılması bu hayvanlarda pulmoner fibrozisin azaltılmasına neden olur (Nakao ve diğ., 1999). Bu çalışmalar, fibrotik fare akciğerlerinde Smad2/3 proteinlerinin fosforilasyonu, Smad4 proteinin nukleusa transferinin uyarılmasının ve Smad7 inhibitör protein miktarının azaltılmasının Smad bağımlı TGF- β sinyalinin aktive olmasına, TGF- β 1'in hedef genlerinden α -SMA ve prokollajen-1 genlerinin ekspresyonunun artmasına neden olduğunu ve akciğerde fibrotik bir yanıtın geliştiğini göstermektedir. GRP'nin TGF- β sinyal yolunu uyardığına dair direkt kanıt bulunmamaktadır. Ancak, radyasyona maruz kalan farelerin fibrotik akciğerleri üzerinde yapılan bir çalışmada, artan p-Smad2/3⁺ hücre sayısının radyasyon maruziyetini takip eden 1 saatte ve 20. haftaya kadar bu farelere GRP inhibitörünün verilmesi ile fibrozisin gerilemesi sonrasında azaldığı saptanmıştır. Çalışmamızda, *TGFB1*, *SMAD3* ve *SMAD4* mRNA'ları ile Smad2/3, p-Smad2/3 ve Smad4 protein miktarlarının artırılması, *SMAD7* mRNA'sının azaltılması yolları ile GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde Smad3 bağımlı TGF- β 1 sinyalinin uyarıldığı ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlara göre GRP'nin fibroblast-miyofibroblast farklılaşmasını Smad3 bağımlı TGF- β sinyal yolu aracılığıyla uyardığı ilk defa tespit edilmiştir. Diğer yandan, CGRP'nin de TGF- β sinyal yolunu uyarma yolu ile pulmoner fibrozise neden olabileceğine dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Sıçan akciğerlerinden izole edilen ve TGF- β 1 ile uyarılan primer fibroblastlar, CGRP (1, 10 ve 100 nmol/L) ile uyarıldıklarında bu hücrelerde, α -SMA, kollajen-1 ve p27 protein miktarının azaldığı gözlemlenmiştir (Li ve diğ., 2016). Bu verilere dayanarak CGRP ve TGF- β sinyalleme arasında bir bağlantı kurmak mümkün değildir. Bize göre bu hücrelerde hücre proliferasyon inhibitörü miktarının azalması bu hücrelerin farklılaşmadan ziyade hücre çoğalmasına yönelmesine neden olabilir. Bu durumda CGRP'nin miyofibroblast farklılaşmasını geriletme yönündeki etkisi TGF- β 'dan bağımsızdır. Çalışmamız, MRC5 fibroblastlarının miyofibroblastlara farklılaşmasında CGRP'nin TGF- β sinyalini aktive ettiğine dair direkt

kanıtlar sunmaktadır: CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde Smad2/3 mRNA'ları, Smad4 mRNA ve protein seviyelerini, Smad2/3 aktivasyonunu artırıp, Smad7 transkripsiyonunu azaltarak fibroblast/miyofibroblast farklılaşmasını uyarır. Bu sonuçlara göre, CGRP'nin fibroblast-miyofibroblast farklılaşmasını Smad2/3 aracılı TGF- β sinyal yolu aracılığıyla uyardığı ilk kez çalışmamız verileriyle ortaya çıkarılmıştır.

Wnt sinyal yolu akciğer biyolojisinde, gelişiminde ve patogenezinde özellikle pulmoner fibroziste önemli rol oynayan bir hücre içi sinyal iletim yoludur (Baarsma ve Konigshoff, 2017; Shi ve diğ., 2017). En iyi karakterize edilen Wnt sinyal yolu β -katenin bağımlı yoldur. Aktif Wnt ligandlarının bulunmadığı durumda β -katenin, GSK-3 β , AXIN, CK1, APC ve PP2A'dan oluşan bir yıkım kompleksi tarafından fosforillenerek proteozomal yıkıma yönlendirilir. Aktif Wnt ligandının bulunduğu durumda ise iki ayrı membrana bağlı reseptör FZD ve Lrp5/6 ligandın bağlanmasıyla aktive olduğu ve yıkım kompleksinin dağılmasına yol açarak β -kateninin fosforilasyonunun engellendiği saptanmıştır. Bu sayede β -katenin sitoplazmada birikerek nükleusta hedef gen ekspresyonlarını uyardığı bulunmuştur (Logan ve Nusse, 2004; Moon ve diğ. 2004). İPF'li hastalardan elde edilen akciğer doku kesitlerinde nuklear β -kateninde artış tespit edilmiştir (Chilosi ve diğ., 2003). Ayrıca bir başka çalışmada İPF'de mikroarray profilendirme çalışmaları sonrasında Wnt hedef genlerinden (MMP7, Wnt ile uyarılan sinyal yolu proteini (Wisp1) ve frizzled ilişkili protein (Sfrp2) ekspresyonlarının arttığı saptanmıştır (Selman ve diğ., 2006; Yang ve diğ., 2007). Başka bir çalışmada ise İPF'de aktif β -katenin seviyelerinin arttığı ve dolayısıyla Wnt sinyal yolunun aşırı aktive olduğu ortaya çıkarılmıştır (Shi ve diğ., 2017). Akhmetshina ve diğ. (2012), fibroblastlarda ve fare akciğerlerinde kanonikal Wnt sinyalinin TGF- β aracılı fibrozis için gerekli olduğunu saptamışlardır. Ek olarak bu çalışmada transgenik farelerde Dkk1'in aşırı ekspresyonunun pulmoner fibrozisi önlediği ortaya konulmuştur. Çalışmalarında TGF- β ile uyarılan fibroblastlarda Dkk1'in ekspresyonu azaldığında Wnt sinyal yolunun uyarıldığını belirlemişlerdir. Bir diğer çalışma da ise insan IMR-90 fibroblastlarına TGF- β uygulamasının Wnt aktivasyonunu uyardığı saptanmıştır (Wang ve diğ., 2015). GRP'nin Wnt sinyal yoluyla ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. CGRP, Wnt/ β -katenin sinyal yolu aracılığıyla epidermal kök hücrelerinin proliferasyonunu uyarır (Dong ve diğ., 2010). Bir diğer çalışmada, CGRP'nin sıçan akciğerlerini hiperoksi kaynaklı oksidatif hasardan Wnt7b/ β -katenin sinyal yolu aktivasyonu ile koruduğu belirlenmiştir (Wang ve diğ., 2018). İnsan osteoblastlarıyla gerçekleştirilen *in vitro* bir çalışmada, CGRP ile kanonikal Wnt sinyal yolu ve

apoptoz arasında bir ilişki bulunmuştur. Primer insan osteoblast kültürüne 15dk-6 saatlik süreler arasında 10^{-8} M CGRP uygulanması sonrasında ilk 60 dakikada osteoblast hücrelerinde β -katenin seviyelerinin yükselmeye başladığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada hücrelere cAMP/PKA yolağının aktivatörü olan 5 mM forskolin uygulamasının da sitoplazmik β -katenin ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır (Villa ve diğ., 2006). Araştırmacılar CGRP'nin β -kateninin sitoplazmadaki stabilizasyonunda PKA'nın rolünü saptamak için spesifik PKA inhibitörü olan H89 (2×10^{-6} M) 'u, CGRP uygulamasından 30 dakika önce uyguladıklarında β -kateninin stabilize edilemediği gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada CGRP'nin GSK3 β üzerine etkisi H89 inhibitörünün olduğu ve olmadığı kültür koşullarında araştırılmıştır (Villa ve diğ., 2006). CGRP uygulandıktan sonraki 15 dakikada GSK3 β fosforilasyonunda önemli bir artış gözlenirken, H89 inhibitörünün bulunduğu durumda GSK3 β 'nin aktivasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Böylelikle, CGRP aracılı GSK3 β fosforilasyonunda PKA'nın önemli bir role sahip olduğu anlaşılmıştır. Çalışmamızda GRP ve CGRP'nin MRC5 hücrelerinde Wnt sinyal aktivasyonunu uyardığına dair kanıtlar sunulmaktadır. GRP, MRC5 hücrelerinde aktif- β katenin ve total β -katenin protein seviyelerini arttırmaktadır. Ayrıca GRP, bu hücrelerin miyofibroblast farklılaşma sürecinde β -katenin mRNA seviyelerini artırırken, Dkk1 mRNA seviyelerini azaltmaktaydı. Buna karşın GRP'nin GSK-3 β , AXIN ve LEF1 mRNA seviyeleri üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır. CGRP'nin ise aktif β -katenin protein seviyelerini ilk 48 saatte azaltmasına rağmen, 72. saate doğru anlamlı düzeylerde artırdığı belirlenmiştir. CGRP, *DKK1* gen ekspresyonunu azalmaktadır. Ancak *CTNNB1*, *GSK3B*, *AXIN1* ve *LEF1* gen ekspresyonları üzerinde anlamlı düzeyde bir etkiye sahip olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamızın Wnt verileri ışığında GRP ve CGRP, β -katenin sentezi ve aktivasyonu yoluyla fibroblast-miyofibroblast farklılaşması sürecini uyarmaktadırlar. Çalışmamızın verileri, GRP ve CGRP uyarımı sonrasında insan MRC5 fibroblast hücrelerinde Wnt sinyalinin uyarıldığını göstermektedir. Bu sonuç, GRP ve CGRP'nin Wnt sinyalini uyarmada etkili olabileceğini gösteren ilk sonuç olması bakımından önemlidir.

On dokuz çeşit Wnt proteini (Wnt reseptör ligandı), Wnt sinyallemede görev alır. Wnt ligandlarının pulmoner fibrozisdeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bleomisin ile pulmoner fibrozisi uyarılan farelerin akciğerlerinde, fibrotik yanıtla birlikte akciğerde aktif β -katenin protein miktarının arttığı ve Wnt3a, Wnt4 ve Wnt7a mRNA seviyelerinin yükseldiği belirlenmiştir. Bu farelerde D vitaminin uygulamaları ile pulmoner fibrozis geriletildiğinde,

aktif β -katenin protein, Wnt3a, Wnt4 ve Wnt7a ligandlarının seviyeleri de azalmaktadır (Zhang ve diğ., 2013). Bir diğ.er çalışmada, normal insan akciğ.er fibroblastları ve 3D insan akciğ.er doku kùltürüne eksojen Wnt4 ve Wnt5a ilavesinin bir miyofibroblast belirteci olan S100A4 mRNA seviyelerini arttırdığı tespit edilmiş ve bu Wnt ligandlarının miyofibroblast farklılaşmasında rol oynayabilecekleri ileri sür÷lmüştür (Kovacs ve diğ., 2014). Wnt4'nin, renal fibroziste medullar ve interstisiyel miyofibroblastlar tarafından üretildiği bildirilmektedir. Böbrek fibrozisi boyunca Wnt4⁺ miyofibroblastların sayısı artmaktadır. Perisit benzeri hücrelerde yapılan *in vitro* deneyler, eksojen Wnt4 uygulamaları sonrasında bu hücrelerin α -SMA üretmeye başlayarak miyofibroblastlara farklılaştıklarını göstermektedir. Dolayısı ile Wnt4/ β -katenin sinyallemeinin erişkin insan böbreğinde miyofibroblast farklılaşmasına neden olarak fibrozis sürecine katkı sağladığı düşün÷lmektedir (DiRocco ve diğ., 2013). UIP paternli ve sağlıklı insan akciğ.er dokularından izole edilen primer fibroblastlarda gerç.ekleştirilen mikroarray analizler, kontrol dokulardan elde edilen fibroblastlara kıyasla UIP hastaların akciğ.erlerinden izole edilen fibroblastlarda Wnt5a ekspresyon profilinin yüksek olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada, UIP hastaların akciğ.erlerinden izole edilen primer fibroblastlar eksojen Wnt5a ile uyarıldığıklarında, bu hücrelerin çoğaldıkları ve apoptoza karşı direnç gösterdikleri saptanmıştır. Araştırmacılar, Wnt5a tarafından düzenlenen bu etkilerin, fibroblastlarda aktif β -katenin seviyelerinin azalması nedeniyle Wnt/ β -katenin sinyal yolundan bağımsız olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak, sağlıklı insan akciğ.erlerinden izole edilen primer fibroblastlarda eksojen Wnt5a uygulamalarının bu hücrelerin çoğalmasını uyarmak yerine bu hücrelerde fibronektin ve alfa (5)-integrin seviyelerinin artışına neden olmaktadır. Bu verilere göre, Wnt5a normal ve fibrotik akciğ.erlerden izole edilen fibroblastlarda farklı etkiler gösterebilmektedir. Wnt5a'nın, UIP paternli insan akciğ.erinde fibroblast çoğalmasını uyarma yolu ile pulmoner fibrozise katkı sağlayabileceği düşün÷lmektedir (Vuga ve diğ., 2009). İPF'li insan ve fibrotik hayvan akciğ.erlerinden elde edilen BAL sıvılarındaki eksozomal veziküller içinde Wnt5a varlığı belirlenmiştir. İPF'li insan akciğ.erlerinden izole edilen primer fibroblastlarda, TGF- β tarafından üretimi uyarılan Wnt5a'nın pulmoner fibroblastların proliferasyonunu uyardığı tespit edilmiştir (Martin-Medina ve diğ., 2018). İPF'li hastaların akciğ.er dokularında havayolu epiteli ile alveolar epitelde, düz kas hücrelerinde, endotelde, fibroblastik odaklardaki miyofibroblastlarda Wnt5a'nın üretildiği saptanmıştır. Bu hastalardan izole edilen primer fibroblastlar ile düz kas hücreleri üzerinde yapılan deneylerde, kùltür koşullarında ekspresyonu aşırı uyarılmış Wnt7b'nın normal insan düz kas ve fibroblast hücrelerinde Wnt5a protein ekspresyonunu önemli düzeylerde arttırdığı, ancak bu koşulların

Wnt5a'nın hali hazırda yüksek seviyelerde olduğu İPF miyofibroblastlarında Wnt5a seviyelerin etkilemediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, Wnt5a İPF'li akciğerin pek çok hücresi tarafından üretilmektedir ve ekspresyonu TGF- β 1 ve Wnt7b ile arttırılmaktadır (Newman ve diğ., 2016). TGF- β ve Wnt sinyal yolu ilişkisinin saptandığı bir diğer *in vitro* çalışmada, TGF- β 1 ile uyarılan insan akciğer fibroblastlarında Wnt reseptörlerinden Frizzled-7 (FZD-7)'nin ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. FZD-7, Wnt5a ile etkileşen bir ko-reseptördür. Bu çalışmada ayrıca FZD-7'nin ekspresyonunun, TGF- β ile pulmoner fibrozisi uyarılan fare akciğerlerinde de arttığı belirlenmiştir. TGF- β 'nin FZD-7 ekspresyonunu Smad3 bağımlı sinyal yolu aracılığı ile arttırdığı saptanmıştır. Ek olarak FZD-7'nin kalıcı olarak sessizleştirildiğinde ise TGF- β 1 ile uyarılan α -SMA, kollajen-1, fibronektin ve CTGF ekspresyonunun inhibe edildiği belirlenmiştir. FZD7'nin inhibisyonu TGF- β ile uyarılan fibrozisi tersine çevirmektedir. Sonuç olarak, TGF- β tarafından ekspresyonu uyarılan FZD7, ECM elemanlarının üretimini, Wnt5a ile etkileşerek kanonikal olmayan Wnt sinyal yolu ile uyarmaktadır (Guan ve Zhou, 2017). Fetal ve postnatal yara onarım sürecinde ve TGF- β ile uyarılan fetal akciğer fibroblastlarında Wnt4 ekspresyonunun arttığı raporlanmıştır (Colwell ve diğ., 2006). İPF'li hastaların akciğerlerinde fibroblastik odaklarda Wnt7b varlığı immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir (Meuten ve diğ., 2012). Gen ekspresyon analizleri, bu bölgelerde Wnt7b mRNA miktarının arttığını göstermektedir. Wnt7b'nin çok miktarda üretiminin akciğer fibroblastlarında prokollajen üretiminin arttırılmasında etkili olduğunu bulmuşlardır (Salazar ve diğ., 2009). Yukarıdaki çalışmaların sonuçları, Wnt4 ve Wnt5a ekspresyonunun TGF- β tarafından uyarılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, Wnt7b/ β -katenin sinyalleme Wnt5a ekspresyonunu da uyarabilmektedir. Wnt4 böbrekte miyofibroblast farklılaşmasını sağlarken, Wnt5a insan akciğer fibroblastlarında proliferasyonu ve ECM üretimini uyarmaktadır. Wnt7a'nın miyofibroblast farklılaşması üzerindeki etkisi hakkında herhangi bir veri bulunmamaktadır. Sadece fibrotik fare akciğerlerinde varlığı saptanmıştır. GRP ve CGRP'nin Wnt ligandları üzerindeki etkilerini açıklayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, GRP ile uyarılan MRC5 fibroblast hücrelerinde, uyarımı takip eden ilk 24 saatte Wnt5a, Wnt7a ve aktif β -katenin seviyeleri azalırken, 72. saatte bu proteinlerin seviyesi anlamlı düzeylerde artmaktadır. Wnt4 protein miktarı ise 24. saatten itibaren 72. saate kadar düzenli bir artış göstermektedir. İlave olarak, çalışmamızda, 10^{-6} M CGRP uygulamaları Wnt4 ligandı üzerinde 10^{-5} M GRP uygulamalarının yarattığı etkiye benzer bir etki göstermiştir. CGRP uygulamaları sonrasında, Wnt5a miktarı ilk 48 saatte değişmezken, 72. saatte pik yapmaktadır, Wnt7a ise ilk 24. saatten itibaren artış gösterir. Buna göre GRP ve

CGRP, MRC5 hücrelerinde Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a ligandları aracılığıyla miyofibroblast farklılaşmasını kontrol ettikleri söylenebilir. Bu düşüncemiz GRP uyarımının deneyin 72. saatinde miyofibroblast farklılaşmasının ve ECM üretiminin pik yaptığı zaman diliminde TGF- β sinyalinin ve β -katenin aktivasyonunun yüksek olarak bulunması ile desteklenmektedir. GRP ve CGRP, TGF- β ve Wnt sinyal yollarının aktivasyonu ile fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını ve ECM üretimi uyarmaktadır.

Çalışmamızın orijinal bulgularından birisi de GRP ve CGRP'nin MRC5 fibroblast hücrelerini parakrin sinyallenmenin yanısıra otokrin sinyallenme ile de etkileyebileceklerinin gösterilmesidir. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde bu peptidleri kodlayan *GRP* ve *CALCA* genlerinin ekspresyonunu uyarmaktadır. GRP, MRC5 hücrelerinde kendi reseptörünün gen ekspresyonunu uyardığında etkili olmazken, CGRP kendi reseptörünün gen ekspresyonunu arttırmaktadır. GRP ve CGRP peptidleri PNEC'lerden salındıktan sonra hedef hücrelerinin hücre zarında yerleşen reseptörlerine bağlanarak hücrede G protein aracılı sinyalleme başlatırlar. GRP ve CGRP tarafından başlatılan sinyallemede aktive olan G protein, fosfolipaz C'yi veya adenilat siklazı uyarabilir. Daha sonra sitoplazmada artan Ca^{++} veya cAMP konsantrasyonu protein kinaz A veya C'yi aktifler ve böylece hücredeki hedef proteinlerin/enzimlerin aktivasyonu uyarılır (Bihlmayer ve diğ., 2001; Rozengurt ve diğ., 2002; Matsui ve diğ., 2014). Çalışmamızda GRP uyarımının MRC5 hücrelerinde *PKA* gen ekspresyonunu azaltırken, *PKCD* ve *PKCZ* gen ekspresyonlarını anlamlı düzeylerde arttırdığı saptanmıştır. CGRP uyarımı ise bu hücrelerde *PKCD* gen ekspresyonunu 72. saatte anlamlı düzeyde artırırken *PKA* ve *PKCZ* gen ekspresyonlarını anlamlı ölçüde etkilememiştir. Ayrıca, GRP, CGRP ve TGF- β uygulamaları, MRC5 hücrelerinde *CREB1* gen ekspresyonunu anlamlı düzeylerde etkilememiştir. Protein kinazlar, kanonikal olmayan TGF- β ve Wnt sinyallemede görev alabilirler. Örneğin, birçok hücrede TGF- β aracılı hedef genlerinin aktivasyonu Smadlara ek olarak aktif *PKCD*'yi gerektirir. İPF'li ve normal akciğer dokularından elde edilen primer fibroblastlarda TGF- β 'nin *PKCD* aktivitesini uyardığı ve *PKCD* inhibisyonunun TGF- β aracılı kollajen ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (Zhang ve diğ., 2004). Bir diğer çalışmada, insan fetal akciğer fibroblast hücrelerinde TGF- β 1 aracılığı ile fibronektin ekspresyonunun 4 kat artırılmasında *PKCD*, fosfotidilkolin spesifik fosfolipaz C, tirozin kinaz ve protein kinaz p38'in etkili olduğu bildirilmiştir (Kucich ve diğ., 2000). Bu sonuçlar, *PKCD* ve TGF- β sinyali arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda eksojen TGF- β ile uyarılan MRC5 hücrelerinde GRP, CGRP ve onların reseptörlerini kodlayan genlerin

ekspresyonunda bir artış belirlenmesi, TGF- β ve GRP/CGRP sinyallerin birbirlerini sinerjistik olarak etkileyebileceklerini işaret etmektedir. Araştırmalar, PKCD ve TGF- β sinyali arasında karşılıklı sinerjistik bir etkileşimin olduğunu, PKA ve TGF- β sinyali arasında ise antagonist bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Karaciğer kanser hücre hattı olan Hep2G2 hücrelerine CGRP uygulamasından sonraki 4. saatte cAMP/PKA aktivasyonun uyarıldığı, TGF- β 1/MAPK sinyal aktivasyonunun baskılandığı tespit edilmiştir (Matsui ve diğ., 2014). Çalışmamızda GRP ve CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde PKA ve PKCZ gen ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmezken PKCD gen ekspresyonunda anlamlı artışlar, GRP ve CGRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde TGF- β sinyalinin aktivasyonuna katkı sağlamış olabilir. Diğer yandan, PKCZ ve PKA ile Wnt sinyalleme arasında bir etkileşim olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. PKCZ ve Wnt sinyal yolağı arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, PKCZ'nin kolon kanseri hücre hatlarında kanonikal Wnt sinyal yolağının pozitif düzenleyicisi olduğu saptanmıştır. PKCZ'nin siRNA ile inhibe edildiği durumda nukleusdan sitoplazmaya hızlı bir β -katenin kaçıışı olduğu, dolayısıyla PKCZ'nin β -kateninin nuklear lokalizasyonunu düzenlediği belirlenmiştir (Luna-Ulloa ve diğ., 2011). Bu veriler, PKCZ'nin kanonikal Wnt sinyal yolağının pozitif düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Diğer bir çalışmada, malignat olmayan hücrelerin Wnt agonistleri ile uyarılması sonrasında PKCZ aracılı GSK-3 β fosforilasyonunun azaldığı ve Wnt/ β -katenin sinyalinin uyarıldığı ortaya çıkarılmıştır (Tejeda-Muñoz ve diğ., 2015). Çalışmamızda GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde PKCZ gen ekspresyonunda anlamlı artışlar, bu hücrelerde Wnt/ β -katenin sinyalinin aktivasyonuna katkı sağlamış olabilir. Çalışmamız sonuçlarına göre, GRP/CGRP, TGF- β ve Wnt sinyal yolları arasında karşılıklı etkileşimler, MRC5 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasında ve ECM elemanlarının üretiminde etkin rol oynamaktadırlar. Böylece, MRC5 hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasında üç sinyal yolu arasındaki bu karşılıklı etkileşim ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

PNEC'ler, tüm omurgalı hayvan ve insan akciğerlerinde solunum yollarının iç yüzünü döşeyen epitel içinde bulunan hücrelerdir. Bu hücreler, ürettikleri çeşitli peptidler ile akciğerdeki çeşitli tip hücrelerin biyolojik davranışlarını parakrin ya da endokrin yol ile düzenlerler (Oztay, 2000). PNEC'ler, memeli akciğerlerindeki GRP ve CGRP'nin hücre kaynaklarından biridir. Bu hücreler, GRP ve CGRP yanısıra bombesin, kolesistokinin, kalsitonin, somatostatin ve P maddesi gibi peptidleri de üretmektedirler. Yapılan çalışmalar, PNEC'lerin ürettiği salgıladıkları bu peptidler ile sağlıklı akciğerde ve çeşitli hastalık durumlarında akciğerlerin metabolik

işlevlerinde, solunum fizyolojisinde, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi hücrenel süreçlerde aktif görevler üstlenebileceklerini açıkça göstermektedir. UIP ve NSIP gibi çeşitli interstisiyel pnömoni formlarında PNEC sayısında veya hiperplazisinde bir artış rapor edilmekte ve fibrotik insan akciğerlerinde bronşiyollerde hiperplastik odaklarda GRP'nin varlığı bildirilmektedir (Tsutsumi ve diğ., 1983; Gosney ve diğ., 1989). Deneysel çalışmalarda da fibrotik fare akciğerlerinde GRP ve CGRP içeren PNEC sayısında artışlar tespit edilmiştir (Zhou ve diğ., 2013; Liu ve diğ., 2014). Ancak, PNEC'lerden salınan peptidlerin pulmoner fibrozisle ilişkili olabileceğini gösteren bu deneysel çalışmalar, fibrotik yanıt oluşumunda rol oynayan moleküler mekanizmaları açıklamada yetersiz kalmıştır. Çalışmamızda GRP ve CGRP peptidlerinin hücre proliferasyonu, miyofibroblast farklılaşması ve EMT gibi pulmoner fibrozise katkı sağlayan süreçlerde etkili olup olmadıkları ilk kez detaylı olarak araştırılmış ve TGF- β ve Wnt sinyal yolları gibi pulmoner fibroziste etkili sinyal yolları ile karşılıklı etkileşimleri incelenmiştir. Çalışmamızın verilerine dayanarak, ulaşılan sonuçlar ve çıktılar şöyle sıralanabilir:

1. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde doza bağlı olarak hücre proliferasyonu ve bu hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını uyarırken, A549 hücrelerinde sadece hücre proliferasyonu uyarma yönünde etki gösterirler.
2. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinin miyofibroblastlara farklılaşmasını sağlarken, A549 hücrelerinin EMT aracılığı ile miyofibroblastlara farklılaşmasında etkili değildir.
3. İnsan akciğer fibroblastları bu peptidlerin fibrotik yanıt oluşturmada etkili oldukları başlıca hedef hücrelerdir. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde doza bağlı olarak erken dönemde hücre proliferasyonu ve geç dönemde bu hücrelerin miyofibroblastlara farklılaşmasını uyararak pulmoner fibrozis patogeneze katkı sağlar.
4. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde miyofibroblast farklılaşması yanısıra, zamana bağlı olarak kollajen (gen ve protein) ve fibronektin protein sentezini de uyarır.
5. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde miyofibroblast farklılaşmasının ve ECM elemanlarının üretimini Smad bağımlı TGF- β sinyal aktivasyonu aracılığı ile uyarmaktadır.
6. GRP özellikle Smad3, CGRP ise Smad2/3 aracılığı ile TGF- β sinyalini düzenler.

7. GRP ve CGRP, MRC5 fibroblast hücrelerinde Wnt/ β -katenin sinyalini uyararak miyofibroblast farklılaşması ve ECM elemanlarının üretimini sağlar.
8. GRP ve CGRP, MRC5 hücrelerinde Wnt4, Wnt5a ve Wnt7a ligandları aracılığıyla miyofibroblast farklılaşmasını kontrol ederler.
9. GRP ile uyarılan MRC5 hücrelerinde *PKCD* ve *PKCZ* gen ekspresyonunda anlamlı artışlar, bu hücrelerde TGF- β ve Wnt sinyallerinin aktivasyonuna katkı sağlar.
10. GRP ve CGRP pulmoner fibrozisin tedavisinde hedef moleküllerdir. GRP ve CGRP sinyallerinin inhalasyon yoluyla verilen çeşitli spesifik inhibitörler, antagonistler ve siRNA uygulamaları tarafından azaltılması pulmoner fibrozisin geriletilmesinde denenebilir. *In vitro* deneylerden elde ettiğimiz sonuçların *in vivo* deneyler ile doğrulanması bu moleküllerin terapötik olarak kullanılma şansını arttıracaktır.

KAYNAKLAR

- Adriaensen, D., Brouns, I., Van Genechten, J., Timmermans, J.P., 2003, Functional morphology of pulmonary neuroepithelial bodies: extremely complex airway receptors, *The Anatomical Record Part A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology*, 270(1), 25-40.
- Akhmetshina, A., Palumbo, K., Dees, C., Bergmann, C., Venalis, P., Zerr, P., Horn, A., Kireva, T., Beyer, C., Zwerina, J., Schneider, H., Sadowski, A., Riener, M.O., MacDougald, O.A., Distler, O., Schett, G., Distler, J.H., 2012, Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis, *Nature Communication*, 3:735.
- American Cancer Society, 2014, *Cancer Facts & Figures*, Atlanta: American Cancer Society.
- American Thoracic Society and European Respiratory Society, 2002, American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias, *American Journal of Respiratory Critical and Care Medicine*, 165(2), 277-304.
- Ammar, Y.A., Ismail, M.M., El-Sehrawi, H.M., Noaman, E., Bayomi, A.H., Shower, T.Z., 2006, Novel pirfenidone analogues: synthesis of pyridine-2-ones for the treatment of pulmonary fibrosis, *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*, 339 (8), 429-436.
- Anastasi, A., 1971, Alytesin and bombesin, two peptide analogs from amphibian skin, *Naunyn Schmiedebergs Archive fur Pharmakologie*, 269(2), 135-139.
- Arciniegas, E., Frid, M.G., Douglas, I.S., Stenmark, K.R., 2007, Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 293(1), L1-L8.
- Ashour, K., Shan, L., Lee, J. H., Schlicher, W., Wada, K., Wada, E., & Sunday, M. E., 2006, Bombesin inhibits alveolarization and promotes pulmonary fibrosis in newborn mice, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(12), 1377-1385.
- Ask, K., Bonniaud, P., Maass, K., Eickelberg, O., Margetts, P.J., Warburton, D., Groffen, J., Gauldie, J., Kolb, M., 2008, Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(3), 484-495.
- Azuma, M., Nishioka, Y., Aono, Y., Inayama, M., Makino, H., Kishi, J., Shono, M., Kinoshita, K., Uehara, H., Ogushi, F., Izumi, K., Sone, S., 2007, Role of α -acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice, *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176, 1243-1250.
- Baarsma, H.A. and Königshoff, M., 2017, 'WNT-er is coming': WNT signalling in chronic lung diseases, *Thorax*, 72(8), 746-759.

- Barratt, S.L., Flower, V.A., Pauling, J.D., Millar, A.B., 2018, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and fibrotic lung disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1269.
- Becker, K.L., Nash, D., Silva, O.L., Snider, R.H., Moore, C.F., 1981, Increased serum and urinary calcitonin in patients with pulmonary disease, *Chest*, 211-216.
- Bellaye, P.S., Wettstein, G., Burgy, O., Besnard, V., Joannes, A., Colas, J., Causse, S., Marchal-Somme, J., Fabre, A., Crestani, B., Kolb, M., Gauldie, J., Camus, P., Garrido, C., Bonniaud, P., 2014, The small heat-shock protein α B-crystallin is essential for the nuclear localization of Smad4: impact on pulmonary fibrosis, *The Journal of Pathology*, 232(4), 458-472.
- Bhaskaran, M., Kolliputi, N., Wang, Y., Gou, D., Chintagari, N.R., Liu, L., 2007, Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor β 1 through the Smad pathway, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 3968-3976.
- Bihlmayer, A., Ammon, H.P., Wahl, M.A., 2001, Distribution and stimulation by gastrin-releasing peptide of protein kinase C subfamilies in insulin-secreting cells, *Neuroendocrinology*, 73(5), 352-357.
- Billings, C.G. and Howard, P., 1994, Hypothesis: exposure to solvents may cause fibrosing alveolitis, *European Respiratory Journal*, 7(6), 1172-1176.
- Borges, M., Linnoila, R.I., Van De Velde, H.J., Chen, H., Nelkin, B.D., Mabry, M., Baylin, S.B., Ball, D.W., 1997, An achete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung, *Nature*, 386, 852-855.
- Borie, R., Justet, A., Beltramo, G., Manali, E.D., Pradère, P., Spagnolo, P., Crestani, B., 2016, Pharmacological management of IPF, *Respirology*, 21(4), 615-625.
- Boyacı, H., Maral, H., Turan, G., Basyigit, I., Dillioglugil, M.O., Yıldız F., Tugay, M., Pala, A., Ercin, C., 2006, Effects of erdosteine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 281 (1-2), 129-137.
- Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Caroleo, M.C., Buanne, P., Costa, N. Starace, G., Lundeberg, T., 2005, Endogenous NGF regulates CGRP expression in human monocytes, and affects HLA-DR and CD86 expression and IL-10 production, *Blood*, 106 (10), 3507-3514.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bringardner, B.D., Baran, C.P., Eubank, T.D., Marsh, C.B., 2008, The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *Antioxidants Redox Signaling*, 10(2), 287-301.

- Carneiro, P.J., Clevelario, A.L., Padilha, G.A., Silva, J.D., Kitoko, J.Z., Olsen, P.C., Capelozzi, V.L., Rocco, P.R., Cruz, F.F., 2017, Bosutinib therapy ameliorates lung inflammation and fibrosis in experimental silicosis, *Frontiers in Physiology*, 8, 159.
- Chen, J. and Stubbe, J., 2005, Bleomycin: towards better therapeutics, *Nature Reviews Cancer*, 5, 102-112.
- Chen, X., Peng, H., Xiao, J., Guan, A., Xie, B., He, B., Chen, Q., 2017, Benzo(a)pyrene enhances the EMT-associated migration of lung adenocarcinoma A549 cells by upregulating Twist1, *Oncology Reports*, 38(4), 2141-2147.
- Chilosi, M., Poletti, V., Zamo, A., Lestani, M., Montagna, L., 2003, Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis, *The American Journal of Pathology*, 162(5), 1495-1502.
- Chioma, O.S. and Drake, W.P., 2017, Role of Microbial Agents in Pulmonary Fibrosis, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 219-227.
- Cho, T., Chan.W., Cutz E., 1989, Distribution and frequency of neuro-epithelial bodies in post-natal rabbit lung: quantitative study with monoclonal antibody against serotonin, *Cell and Tissue Research*, 255(2), 353-362.
- Coker, R.K., Laurent, G.J., Jeffery, P.K., Bois, R.M., Black, C.M., McAnulty, R.J., 2001, Localisation of transforming growth factor beta1 and beta3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung, *Thorax*, 56(7), 549-556.
- Colwell, A.S., Krummel, T.M., Longaker, M.T., Lorenz, H.P., 2006, Wnt-4 expression is increased in fibroblasts after TGF-beta1 stimulation and during fetal and postnatal wound repair, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(7), 2297-2301.
- Conte, E., Gili, E., Fagone, E., Fruciano, M., Iemmolo, M., Vancheri, C., 2014, Effect of pirfenidone on proliferation, TGF- β -induced myofibroblast differentiation and fibrogenic activity of primary human lung fibroblasts, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 13-19.
- Corjay, M.H., Corjay, M.H., Dobrzanski, D.J., Way, J.M., Viallet, J., Shapira, H., Worland, P., Sausville, E.A., Battey, J.F., 1991, Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 266(28), 18771-18779.
- Cruz, F.F., Horta, L.F., Marialde, A., Lopes-Pacheco, M., da Silva, A.B., Morales, M.M., Gonçalves-de-Albuquerque, C.F., Takiya, C.M., de Castro-Faria-Neto, H.C., Rocco, P.R., 2016, Dasatinib reduces lung inflammation and fibrosis in acute experimental silicosis, *PLoS One*, 11(1), e0147005.
- Cullen, A., Emanuel, R.L., Torday, J.S., Asokanathan, N., Sikorski, K.A., Sunday, M.E., 2000, Bombesin-like peptide and receptors in lung injury models: diverse gene expression, similar function, *Peptides*, 21(11), 1627-1638.

- Cutz, E., 1997, Introduction to pulmonary neuroendocrine cell system, structure-function correlations, *Microscopy Research and Technique*, 37(1), 1-3.
- Cutz, E., Gillan, J.E., Track, N.S., 1984, Pulmonary endocrine cells in the developing human lung and during neonatal adaptation. In : "Endocrine Lung in Health and Disease" Becker LK and Gazdar A, Eds, W. B. Saunders, *Philadelphia*, 210-231.
- Cutz, E., Yeger, H., Pan, J., Ito, T., 2008, Pulmonary neuroendocrine cell system in health and disease, *Current Respiratory Medicine Reviews*, 4(3), 174-186.
- Dadrich, M., Nicolay, N.H., Flechsig, P., Bickelhaupt, S., Hoeltgen, L., Roeder, F., Hauser, K., Tietz, A., Jenne, J., Lopez, R., Roehrich, M., Wirkner, U., Lahn, M., Huber, P.E., 2015, Combined inhibition of TGF β and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis, *Oncoimmunology*, 5(5), e1123366.
- Daniels, C.E., Lasky, J.A., Limper, A.H., Mieras, K., Gabor, E., Schroeder, D.R., 2010, Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo controlled trial results, *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(6), 604-610.
- De la Fuente, M., Del Rio, M., Ferrandez, M.D., Hernanz, A., 1991, Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C, *Immunology*, 73(2), 205-211.
- Denham, J.W. and Hauer-Jensen, M., 2002, The radiotherapeutic injury--a complex 'wound', *Radiotherapy and Oncology*, 63(2), 129-145.
- DiRocco, D. P., Kobayashi, A., Taketo, M. M., McMahon, A. P., Humphreys, B. D., 2013, Wnt4/ β -catenin signaling in medullary kidney myofibroblasts, *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(9), 1399-1412.
- Dong, J., He, Y., Zhang, X., Wang, L., Sun, T., Zhang, M., Liang, Y., Qi, M., 2010, Calcitonin gene-related peptide regulates the growth of epidermal stem cells in vitro, *Peptides*, 31(10), 1860-1865.
- Emanuel, R.L., Torday, J.S., Mu, Q., Asokanathan, N., Sikorski, K.A., Sunday, M.E., 1999, Bombesin-like peptides and receptors in normal fetal baboon lung: roles in lung growth and maturation, *The American Journal of Physiology*, 277, L1003-L1017.
- Fehrenbach, H., 2001, Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited, *Respiratory Research*, 2(1), 33-46.
- Felderbauer, P., Bulut, K., Hoeck, K., Deters, S., Schmidt, W.E., Hoffmann, P., 2007, Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts--evidence for a TGF- β eta-dependent effect, *International Journal of Colorectal Diseases*, 22(12), 1475-80.
- Fernandez, I.E. and Eickelberg, O., 2012, The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 111-116.

- Fernandez, I.E., Heinzelmann, K., Verleden, S., Eickelberg, O., 2015, Characteristic patterns in the fibrotic lung. Comparing idiopathic pulmonary fibrosis with chronic lung allograft dysfunction, *Annals of the American Thoracic Society*, 12 (Suppl 1), S34-41.
- Fernández-Pérez, E.R., Daniels, C.E., Schroeder, D.R., St Sauver, J., Hartman, T.E., Bartholmai, B.J., Yi, E.S., Ryu, J.H., 2010, Incidence, Prevalence, and Clinical Course of Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *Chest*, 137(1), 129-137.
- Feyrter, F., 1938, Ueber Diffuse Endokrine Epitheliale Organe. Leipzig: J.A. Barth, 545-571.
- Feyrter, F., 1954, Argyrophilia of bright cell system in bronchial tree in man, *Zeitschrift fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung*, 61(1), 73-81.
- François, A., Gombault, A., Villeret, B., Alsaleh, G., Fanny, M., Gasse, P., Adam, S.M., Crestani, B., Sibilia, J., Schneider, P., Bahram, S., Quesniaux, V., Ryffel, B., Wachsmann, D., Gottenberg, J.E., Couillin, I., 2015, B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis, *Journal of Autoimmunity*, 56, 1-11.
- Fubini, B., Hubbard, A., 2003, Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis, *Free Radical Biology and Medicine*, 34(12), 1507-1516.
- Furuie, H., Yamasaki, H., Suga, M., Ando, M., 1997, Altered accessory cell function of alveolar macrophages: a possible mechanism for induction of Th2 secretory profile in idiopathic pulmonary fibrosis, *European Respiratory Journal*, 10, 787-794.
- Garrison, G., Huang, S.K., Okunishi, K., Scott, J.P., Kumar Penke, L.R., Scruggs, A.M., Peters-Golden, M., 2013, Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E(2), *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48, 550-558.
- Gauldie, J., 2002, Pro:Inflammatory mechanisms are a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 165, 1205-1206.
- Gharaee-Kermani, M., Hu, B., Phan, S., Gyetko, M., 2009, Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGF β signaling and the myofibroblast, *Current Medicinal Chemistry*, 16(11), 1400-1417.
- Ghosh, A.K., Yuan, W., Mori, Y., Varga, J., 2000, Smad-dependent stimulation of type I collagen gene expression in human skin fibroblasts by TGF-beta involves functional cooperation with p300/CBP transcriptional coactivators, *Oncogene*, 19(31), 3546-3655.
- Giri, S.N., Hyde, D.M., Hollinger, A.A., 1993, Effect of antibody to transforming growth factor beta on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice, *Thorax*, 48 (10), 959-966.
- Gosney, J.R., Sissons, M.C.J., Allibone, R.O., Blakey, A.F., 1989, Pulmonary endocrine cells in chronic bronchitis and emphysema, *The Journal of Pathology*, 157, 127-133.

- Guan, S., Zhou, J., 2017, Frizzled-7 mediates TGF- β -induced pulmonary fibrosis by transmitting non-canonical Wnt signaling, *Experimental Cell Research*, 359(1), 226-234.
- Gunther, AI., Lubke, N., Ermert, M., Schermuly, R.T., Weissmann, N., Breitecker, A., Markart, P., Ruppert, C., Quanz, K., Ermert, L., Grimminger, F., Seeger, W., 2003, Prevention of bleomycin-induced lung fibrosis by aerosolization of heparin or urokinase in rabbits, *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 168 (11), 1358-1365.
- Gurujeyalakkshmi, G., Giri, S.N., 1995, Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model lung fibrosis: Downregulation of TGF beta and procollagen I and II gene expression, *Experimental Lung Research*, 21 (5), 791-808.
- Guzy, R.D., Li, L., Smith, C., Dorry, S.J., Koo, H.Y., Chen, L., Ornitz, D.M., 2017, Pulmonary fibrosis requires cell-autonomous mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, 292(25), 10364-10378.
- Harari, S. and Caminati, A., 2010, IPF: new insight on pathogenesis and treatment, *Allergy*, 65(5), 537-53.
- Hartopo, A. B., Emoto, N., Vignon-Zellweger, N., Suzuki, Y., Yagi, K., Nakayama, K., Hirata, K., 2013, Endothelin-Converting Enzyme-1 Gene Ablation Attenuates Pulmonary Fibrosis via CGRP-cAMP/EPAC1 Pathway, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(4), 465-476.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M. A., Jr., Wrana, J.L., Falb, D., 1997, The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling, *Cell*, 89, 1165-1173.
- Heldin, CH. and Moustakas, A., 2016, Signaling receptors for TGF- β family members, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(8), a022053.
- Hou, J., Ma, T., Cao, H., Chen, Y., Wang, C., Chen, X., Xiang, Z., Han, X., 2018, TNF- α -induced NF- κ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Journal of Cellular Physiology*, 233(3), 2409-2419.
- Hoyt, R.F., Jr, McNelly, N.A., McDowell, E.M., Sorokin, S.P., 1991, Neuroepithelial bodies stimulate proliferation of airway epithelium in fetal hamster lung, *The American Journal of Physiology*, 260(4 Pt 1), L234-L240.
- Huang, M., Yang, H., Zhu, L., Li, H., Zhou, J., Zhou, Z., 2016, Inhibition of connective tissue growth factor attenuates paraquat-induced lung fibrosis in a human MRC5 cell line, *Environmental Toxicology*, 31(11), 1620-1626.

- Hubbard, R., Lewis, S., Richards, K., Johnston, I., Britton, J., 1996, Occupational exposure to metal or wood dust and aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis, *Lancet*, 347(8997), 284-289.
- Hunninghake, G.W., Lynch, D.A., Galvin, J.R., Gross, B.H., Müller, N., Schwartz, D.A., King, T.E. Jr., Lynch, J.P. 3rd., Hegele, R., Waldron, J., Colby, T.V., Hogg, J.C., 2003, Radiologic findings are strongly associated with a pathologic diagnosis of usual interstitial pneumonia, *Chest*, 124(4),1215-1223.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., Miyazono, K., 1997, Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily, *Nature*, 389, 622-626.
- Ito, T., 1999, Differentiation and proliferation of pulmonary neuroendocrine cells, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 34(4), 245-324.
- Ito, T., Ogura, T., Ogawa, N., 2002, Modulation of pulmonary neuroendocrine cells in idiopathic interstitial pneumonia, *Histology and Histopathology*, 17, 1121-1127.
- Ito, T., Ogura, T., Ogawa, N., Udaka, N., Kitamura, H., 2000, Basic helixloop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine cell differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium, *Development*, 127(18), 3913-3921.
- Ito, T., Udaka, N., Okudela, K., Yazawa, T., Kitamura, H., 2003, Mechanisms of neuroendocrine differentiation in pulmonary neuroendocrine cells and small cell carcinoma, *Endocrine Pathology*, 14(2), 133-139.
- Jaeger, N., Czepielewski, R.S., Bagatini, M., Porto, B.N., Bonorino, C., 2017, Neuropeptide gastrin-releasing peptide induces PI3K/reactive oxygen species-dependent migration in lung adenocarcinoma cells, *Tumour Biology*, 39(3), 1010428317694321.
- Jakubovic, B.D., Donovan, A., Webster, P.M., Shear, N.H., 2013, Methotrexate-induced pulmonary toxicity, *Canadian Respiratory Journal*, 20(3), 153–155.
- Kanemaru, R., Takahashi, F., Kato, M., Mitsuishi, Y., Tajima, K., Ihara, H., Hidayat, M., Wirawan, A., Koinuma, Y., Hayakawa, D., Yagishita, S., Ko, R., Sato, T., Harada, N., Kodama, Y., Nurwidya, F., Sasaki, S., Niwa, S.I., Takahashi, K., 2018, Dasatinib suppresses TGF β -mediated epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells and inhibits pulmonary fibrosis, *Lung*, doi: 10.1007/s00408-018-0134-6.
- Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T., Zhang, Z., 2005, TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT), *Respiratory Research*, 6, 56.
- Kawanami, Y., Morimoto, Y., Kim, H., Nakamura, T., Machida, K., Kido, T., Asonuma, E., Yatera, K., Yoshii, C., Kido, M., 2009, Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells, *Respiratory Research*, 10, 8.
- Kayalar, O. and Oztay, F., 2014, Retinoic acid induced repair in the lung of adult hyperoxic mice, reducing transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) mediated abnormal alterations, *Acta Histochemica*, 116(5), 810-819.

- Kelly, B.G., Lok, S.S., Hasleton, P.S., Egan, J.J., Stewart, J.P., 2002, A rearranged form of Epstein-Barr virus DNA is associated with idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(4), 510-513.
- Kendall, R.T. and Feghali-Bostwick, C.A., 2014, Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators, *Frontiers in Pharmacology*, 5, 123.
- Khalil, N. and O'Connor, R., 2004, Idiopathic pulmonary fibrosis: current understanding of the pathogenesis and the status of treatment, *Canadian Medical Association Journal*, 171(2), 153-160.
- Khalil, N., O'Connor, R.N., Flanders, K.C., Unruh, H., 1996, TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 14(2), 131-138.
- Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., Chapman, H.A., 2006, Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13180-13185.
- King, K.A., Torday, J.S., Sunday, M.E., 1995, Bombesin and [Leu 8] phyllostin promote fetal mouse lung branching morphogenesis via a receptor-mediated mechanism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4357-4361.
- King, T.E., 2008, Bosentan for idiopathic pulmonary fibrosis, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9 (11), 1171-1179.
- King, T.E. Jr., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., du Bois, R.M., Leff, J.A., Nathan, S.D., Sahn, S.A., Valeyre, D., Noble, P.W., 2014, All-cause mortality rate in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Implications for the design and execution of clinical trials, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(7), 825-831.
- King, T.E. Jr., Brown, K.K., Raghu, G., du Bois, R.M., Lynch, D.A., Martinez, F., Valeyre, D., Leconte, I., Morganti, A., Roux, S., Behr, J., 2011, BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(1), 92-99.
- King, T.E., Pardo, Jr., A., Selman, M., 2011, Idiopathic pulmonary fibrosis, *Lancet*, 378(9807), 1949-1961.
- Kovacs, T., Csongei, V., Feller, D., Ernsts, D., Smuk, G., Sarosi, V., Jakab, L., Kvell, K., Bartis, D., Pongracz, J.E., 2014, Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence, *Aging Cell*, 13(5), 838-849.

- Kreuter, M., Bonella, F., Wijsenbeek, M., Maher, T.M., Spagnolo, P., 2015, Pharmacological treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: Current approaches, unsolved issues, and future perspectives, *Biomed Research International*, 2015, 329481.
- Kucich, U., Rosenbloom, J. C., Shen, G., Abrams, W. R., Hamilton, A. D., Sebt, S. M., Rosenbloom, J., 2000, TGF- β 1 stimulation of fibronectin transcription in cultured human lung fibroblasts requires active geranylgeranyl transferase I, phosphatidylcholine-specific phospholipase C, protein kinase C- δ , and p38, but not erk1/erk2, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374(2), 313-324.
- Kusano, S., Kukimoto-Niino, M., Hino, N., Ohsawa, N., Okuda, K., Sakamoto, K., Shirouzu, M., Shindo, T., Yokoyama, S., 2012, Structural basis for extracellular interactions between calcitonin receptor-like receptor and receptor activity-modifying protein 2 for adrenomedullin-specific binding, *Protein Science*, 21(2), 199-210.
- Lauweryns, J.M., Van, Lommel, A.T., Dom, R.J., 1985, Innervation of rabbit intrapulmonary neuroepithelial bodies, Quantitative and qualitative ultrastructural study after vagotomy, *Journal of the Neurological Sciences*, 67, 81-92.
- Lemaire. I., Jones, S., Khan, M.F., 1991, Bombesin-like peptides in alveolar macrophage: increased release in pulmonary inflammation and fibrosis, *Neuropeptides*, 20(1), 63-72.
- Leppäranta, O., Sens, C., Salmenkivi, K., Kinnula, V.L., Keski-Oja, J., Myllärniemi, M., Koli, K., 2012, Regulation of TGF- β storage and activation in the human idiopathic pulmonary fibrosis lung, *Cell and Tissue Research*, 348(3), 491-503.
- Li, X.W., Li, X.H., Du, J., Li, D., Li, Y.J., Hu, C.P., 2016, Calcitonin gene-related peptide down-regulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(12), 1315-1324.
- Li, Y.J., Azuma, A., Usuki, J., Abe, S., Matsuda, K., Sunazuka, T., Shimizu, T., Hirata, Y., Inagaki, H., Kawada, T., Takahashi, S., Kudoh, S., Omura, S., 2006, EM703 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the inhibition of TGF-beta signaling in lung fibroblasts, *Respiratory Research*, 7, 16.
- Limper, A.H., Broekelmann, T.J., Colby, T.V., Malizia, G., McDonald, J.A., 1991, Analysis of local mRNA expression for extracellular matrix proteins and growth factors using in situ hybridization in fibroproliferative lung disorders, *Chest*, 99(3 Suppl), 55S-56S.
- Linnoila, R.I., 2006, Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system, *Laboratory Investigation*, 86, 425-444.
- Liu X., Driskell RR., Engelhardt JF., 2006, Stem Cells in the Lung, *Methods in Enzymology*, 419, 285-321.
- Liu, J., Song, N., Tian, S., Yu, J., 2014, Neuroepithelial body increases in bleomycin-treated mice, *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 193, 52-54.

- Liu, Y., Gao, W., Zhang, D., 2010, Effects of cigarette smoke extract on A549 cells and human lung fibroblasts treated with transforming growth factor- β 1 in a coculture system, *Clinical and Experimental Medicine*, 10(3), 159-167.
- Logan, C.Y., Nusse, R., 2004, The Wnt signaling pathway in development and disease, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781-810.
- Luna-Ulloa, L. B., Hernandez-Maqueda, J. G., Santoyo-Ramos, P., Castaneda-Patlan, M. C., Robles-Flores, M., 2011, Protein kinase C is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines, *Carcinogenesis*, 32(11), 1615-1624.
- Ma, J., He, B., Li, N., Zhang, H., 2002, Intervention by azithromycin on bleomycin induced lung injury in rats and its mechanisms, *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi = Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 25 (7), 392-395.
- Maeyama, T., Kuwano, K., Kawasaki, M., Kunitake, R., Haagimoto, N., Hara, N., 2001, Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by monoclonal antibody to interleukin-12, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 280 (6), L1128-L1137.
- Maher, T.M., Wells, A.U., Laurent, G.J., 2007, Idiopathic pulmonary fibrosis: multiple causes and multiple mechanisms? *European Respiratory Journal*, 30(5), 835-839.
- Margaritopoulos, G.A., Vasarmidi, E., Antoniou, K.M., 2016, Pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: an evidence-based review of its place in therapy, *Core Evidence*, 11, 11-22.
- Marmai, C., Sutherland, R.E., Kim, K.K., Dolganov, G.M., Fang, X., Kim, S.S., Jiang, S., Golden, J.A., Hoopes, C.W., Matthay, M.A., Chapman, H.A., Wolters, P.J., 2011, Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 301(1), L71-L78.
- Marshall, D.C., Salciccioli, J.D., Shea, B.S., Akuthota, P., 2018, Trends in mortality from idiopathic pulmonary fibrosis in the European Union: an observational study of the WHO mortality database from 2001-2013, *The European Respiratory Journal*, 51(1), pii: 1701603.
- Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., 1995, A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function, *Growth Regulation*, 5(2), 69-84.
- Martin-Medina, A., Lehmann, M., Burgy, O., Hermann, S., Baarsma, H. A., Wagner, D. E., De Santis, M.M., Ciolek, F., Hofer, T.P., Frankenberger, M., Aichler, M., Lindner, M., Gesierich, W., Guenther, A., Walch, A., Coughlan, C., Wolters, P., Lee, J.S., Behr, J., Königshoff, M., 2018, Increased Extracellular Vesicles Mediate WNT-5A Signaling in Idiopathic Pulmonary Fibrosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. doi: 10.1164/rccm.201708-1580OC.

- Martyanov, V., Kim, G.J., Hayes, W., Du, S., Ganguly, B.J., Sy, O., Lee, S.K., Bogatkevich, G.S., Schieven, G.L., Schiopu, E., Marangoni, R.G., Goldin, J., Whitfield, M.L., Varga, J., 2017, Novel lung imaging biomarkers and skin gene expression subsetting in dasatinib treatment of systemic sclerosis-associated interstitial lung disease, *PLoS One*, 12(11), e0187580.
- Massague, J., Seoane, J., Wotton, D., 2005, Smad transcription factors, *Genes and Development*, 19, 2783-2810.
- Matsui, S., Yamane, T., Kobayashi-Hattori, K., Oishi, Y., 2014, Calcitonin gene-related peptide regulates mitogen-activated protein kinase pathway to decrease transforming growth factor β 1-induced hepatic plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in HepG2 cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(5), 787-790.
- McDonald, T.J., Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt, V., 1979, Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 90(1), 227-233.
- McGillis, J.P., Humphreys, S., Reid, S., 1991, Characterization of functional calcitonin gene-related peptide receptors on rat lymphocytes, *Journal of Immunology*, 147 (10), 3482-3489.
- Meloni, F., Ballabio, P., Bianchi, L., Mangiarotti, P., Grassi, G., Bignamini, A., Grassi, G.G., 1996, Bombesin enhances monocyte and macrophage activities: possible role in the modulation of local pulmonary defenses in chronic bronchitis, *Respiration*, 63(1), 28-34.
- Meltzer, E.B., Noble, P.W., 2008, Idiopathic pulmonary fibrosis, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3, 8.
- Meuten T, Hickey A, Franklin K, Grossi B, Tobias J, Newman DR, Jennings SH, Correa M, Sannes PL., 2012, WNT7B in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis, *Respiratory Research*, 28, 13, 62.
- Mizuno, S., Matsumoto, K., Li, M.Y., Nakamura, T., 2005, HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: A potential role for MMP- dependent myofibroblast apoptosis, *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19 (6), 580-582.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., Kaykas, A., 2004, WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies, *Nature Reviews. Genetic*, 5(9), 691–701.
- Moore-Morris, T., Tallquist, M.D., Evans, S.M., 2014, Sorting out where fibroblasts come from, *Circulation Research*, 115(7), 602-604.
- Mrak, E., Guidobono, F., Moro, G., Frascini, G., Rubinacci, A., Villa, I., 2010, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) inhibits apoptosis in human osteoblasts by β -catenin stabilization, *Journal of Cellular Physiology*, 225(3), 701–708.

- Muir, D., Varon, S., Manthorpe, M., 1990, An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures, *Analytical Biochemistry*, 185(2), 377-382.
- Musellim, B., Okumus, G., Uzaslan, E., Akgun, M., Cetinkaya, E., Turan, O., Akkoclu, A., Hazar, A., Kokturk, N., Calisir, H.C., Turkish Interstitial Lung Diseases Group., 2014, Epidemiology and distribution of interstitial lung diseases in Turkey, *The Clinical Respiratory Journal*, 8(1), 55-62.
- Nakao, A., Fujii, M., Matsumura, R., Kumano, K., Saito, Y., Miyazono, K., Iwamoto, I., 1999, Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 104, 5–11.
- Nakaya, Y., Sukowati, E.W., Wu, Y., Sheng, G., 2008, RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation, *Nature Cell Biology*, 10, 765-775.
- Nalysnyk, L., Cid-Ruzafa, J., Rotella, P., Esser, D., 2012, Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature, *European Respiratory Review*, 21(126), 355-361.
- Navaratnam, V., Fleming, K.M., West, J., Smith, C.J., Jenkins, R.G., Fogarty, A., Hubbard, R.B., 2011, The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K, *Thorax*, 66(6), 462-467.
- Newman, D. R., Sills, W. S., Hanrahan, K., Ziegler, A., Tidd, K. M., Cook, E., Sannes, P. L., 2016, Expression of WNT5A in idiopathic pulmonary fibrosis and its control by TGF- β and WNT7B in human lung fibroblasts, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 64(2), 99–111.
- Ning, Q., Li, F., Wang, L., Li, H., Yao, Y., Hu, T., Sun, Z., 2018, S100A4 amplifies TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in a pleural mesothelial cell line, *Jornal of Investigative Medicine*, 66(2), 334-339.
- Noble, P.W., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Glassberg, M.K., Kardatzke, D., King, T.E. Jr., Lancaster, L., Sahn, S.A., Szwarzberg, J., Valeyre, D., du Bois, R.M., 2011, CAPACITY Study Group., 2011, Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials, *Lancet*, 377(9779), 1760-1769.
- Okutan, O. and Ayten, O., 2017, Hepatitis C and pulmonary fibrosis, *Tuberküloz ve Toraks*, 65(2), 131-137.
- Okutan, O. and Çalışkan, T., 2011, Sigara ile ilişkili interstisyel akciğer hastalıkları, *Solunum*, 13(3), 131–139.
- Olson, A.L., Swigris, J.J., Raghu, G., Brown, K.K., 2009, Seasonal variation: mortality from pulmonary fibrosis is greatest in the winter, *Chest*, 36(1),16-22.

- Omori, K., Hattori, N., Senoo, T., Takayama, Y., Masuda, T., Nakashima, T., Iwamoto H., Fujitaka K, Hamada H., Kohno, N., 2016, Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates transforming growth factor- β -dependent epithelial mesenchymal transition and differentiation of fibroblasts to myofibroblasts, *Plos One*, 11(2), e0148969.
- Oruqaj, G., Karnati, S., Vijayan, V., Kotarkonda, L.K., Boateng, E., Zhang, W., Ruppert, C., Günther, A., Shi, W., Baumgart-Vogt, E., 2015, Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(16), E2048-E2057.
- Ovet, H. and Oztay, F., 2014, The copper chelator tetrathiomolybdate regressed bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, by reducing lysyl oxidase expressions, *Biological Trace Element Research*, 162(1-3), 189-199.
- Ota, C., Baarsma, H.A. Wagner, D.E., Hilgendorff, A., Königshoff, M., 2016, Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling, *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), 34.
- Oztay, F., 2000, Morphology of lung of *Rana ridibunda* with observations on changes occurring under different conditions, *Turkish Journal of Zoology*, 24, 263-270.
- Oztay, F., 2006, The responses of some pulmonary cells neuroendocrine experimental condition in the lung of *Rana ridibunda*, *Animal Biology*, 56 (3), 373-382.
- Oztay, F., 2008, The functional morphology of the pulmonary neuroendocrine cells in the lung of larval and adult *Rana ridibunda*, *European Journal of Biology*, 67(2),145-151.
- Pan, J., Copland, I., Post, M., Yeger, H., Cutz, E., 2006, Mechanical stretch-induced serotonin release from pulmonary neuroendocrine cells: implications for lung development, *American Journal of Physiology. Lung Cell and Molecular Physiology*, 290(1), L185-L193.
- Pan, J., Yeger, H., Cutz, E., 2002, Neuronal developmental marker FORSE-1 identifies a putative progenitor of the pulmonary neuroendocrine cell lineage during lung development, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50(12), 1567-1578.
- Papiris, S.A., Manali, E.D., Kolilekas, L., Triantafillidou, C., Tsangaris, I., Kagouridis, K., 2012, Steroids in idiopathic pulmonary fibrosis acute exacerbation: defenders or killers? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(5), 587-588.
- Park, Y., Lee, S., Kim, D., Yu, J., Beemelmans, C., Chung, K., Kim, K., 2018, The inhibitory effects of cyclodepsipeptides from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on myofibroblast differentiation in A549 alveolar epithelial cells, *Molecules*, 23(10), 2568.
- Phan, S.H., 2012, Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 9(3), 148–152.

- Philips, N., Burchill, D., O'Donoghue, D., Keller, T., Gonzalez, S., 2004, Identification of benzene metabolites in dermal fibroblasts as nonphenolic: regulation of cell viability, apoptosis, lipid peroxidation and expression of matrix metalloproteinase 1 and elastin by benzene metabolites, *Skin Pharmacology and Physiology*, 17(3),147-152.
- Raghu, G., Collard, H.R., Egan, J.J., Martinez, F.J., Behr, J., Brown, K.K., Colby, T.V., Cordier, J.F., Flaherty, K.R., Lasky, J.A., Lynch, D.A., Ryu, J.H., Swigris, J.J., Wells, A.U., Ancochea, J., Bouros, D., Carvalho, C., Costabel, U., Ebina, M., Hansell, D.M., Johkoh, T., Kim, D.S., King, T.E. Jr., Kondoh, Y., Myers, J., Müller, N.L., Nicholson, A.G., Richeldi, L., Selman, M., Dudden, R.F., Griss, B.S., Protzko, S.L., Schünemann, H.J., ATS/ERS/JRS/ALAT Committee on Idiopathic Pulmonary Fibrosis, 2011, An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(6), 788-824.
- Raghu, G., Million-Rousseau, R., Morganti, A., Perchenet, L., Behr, J.; MUSIC Study Group, 2013, Macitentan for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: the randomised controlled MUSIC trial. *European Respiratory Journal*. 42(6), 1622-1632.
- Raghu, G., Remy-Jardin, M., Myers, J.L., Richeldi, L., Ryerson, C.J., Lederer, D.J., Behr, J., Cottin, V., Danoff, S.K., Morell, F., Flaherty, K.R., Wells, A., Martinez, F.J., Azuma, A., Bice, T.J., Bouros, D., Brown, K.K., Collard, H.R., Duggal, A., Galvin, L., Inoue, Y., Jenkins, R.G., Johkoh, T., Kazerooni, E.A., Kitaichi, M., Knight, S.L., Mansour, G., Nicholson, A.G., Pipavath, S.N.J., Buendía-Roldán, I., Selman, M., Travis, W.D., Walsh, S., Wilson K,C.; American Thoracic Society, European Respiratory Society, Japanese Respiratory Society, and Latin American Thoracic Society, 2018, Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 198(5), e44-e68.
- Raghu, G., Weycker, D., Edelsberg, J., Bradford. W.Z., Oster, G., 2006, Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 174(7), 810-816.
- Ramos, C., Montano, M., Garcia-Alvarez, J., Ruiz, V., Uhal, B.D., Selman, M., Pardo, A., 2001, Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 24, 591-598.
- Reynolds, H.Y.,1998, Diagnostic and management strategies for diffuse interstitial lung disease, *Chest*, 113(1),192-202.
- Reynolds, S.D., Hong, K.U., Giangreco, A., Mango, G.W., Guron, C., Morimoto, Y., Stripp, B.R., 2000, Conditional Clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 278, L1256–L1263.
- Richeldi, L., Cottin, V., Flaherty, K.R., Kolb, M., Inoue, Y., Raghu, G., Taniguchi, H., Hansell, D.M., Nicholson, A.G., Le Maulf, F., Stowasser, S., Collard, H.R., 2014, Design of the INPULSIS™ trials: two phase 3 trials of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Respiratory Medicine*, 108(7), 1023-30.

- Richeldi, L., Davies, H.R., Ferrara, G., Franco, F., 2003, Corticosteroids for idiopathic pulmonary fibrosis, *Cochrane Database Systematic Reviews* (3), CD002880.
- Roth, G.J., Binder, R., Colbatzky, F., Dallinger, C., Schlenker-Herceg, R., Hilberg, F., Wollin, S.L., Kaiser, R., 2015, Nintedanib: from discovery to the clinic, *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(3), 1053-1063.
- Rozengurt, E., Guha, S., Sinnott-Smith, J., 2002, Gastrointestinal peptide signalling in health and disease, *The European Journal of Surgery: Supplement*, (587), 23-38.
- Saito, A., Horie, M., Nagase, T., 2018, TGF- β Signaling in lung health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2460.
- Salazar, K.D., Lankford, S.M., Brody, A.R., 2009, Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts, *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(5), L1002-L1011.
- Scott, J., Johnston, I., Britton, J., 1990, What causes cryptogenic fibrosing alveolitis? A case-control study of environmental exposure to dust, *British Medical Journal*, 301(6759), 1015-1017.
- Selman, M., King, T.E., Pardo, A., American Thoracic Society, European Respiratory Society, American College of Chest Physicians, 2001, Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy, *Annals in Internal Medicine*, 134(2),136-151.
- Selman, M., Pardo, A., 2002, Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder, *Respiratory Research*, 3, 3.
- Selman, M., Pardo, A., 2006, Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis from innocent targets to serial killers, *Proceeding of the American Thoracic Society*, 3(4), 364-72.
- Selman, M., Pardo, A., Barrera, L., Estrada, A., Watson, S.R., Wilson, K., Aziz, N., Kaminski, N., Zlotnik, A., 2006, Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173, 188–198.
- Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., Richeldi, L., 2018, Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management, *Respiratory Research*, 19(1), 32.
- Shi, J., Li, F., Luo, M., Wei, J., Liu, X., 2017, Distinct roles of Wnt/ β -catenin signaling in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis, *Mediators Inflammations*, 2017, 3520581.
- Shimizu, S., Gabazza, E.C., Taguchi, O., Yasui, H., Taguchi, Y., Hayashi, T., Ido, M., Shimizu, T., Nakagaki, T., Kobayashi, H., Fukudome, K., Tsuneyoshi, N., D'Alessandro-Gabazza, C.N., Izumizaki, M., Iwase, M., Homma, I., Adachi, Y., Suzuki, K., 2003, Activated protein C inhibits the expression of platelet derived growth factor in the

- lung, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167 (10), 1416-1426.
- Sime, P.J., Xing, Z., Graham, F.L., Csaky, K.G., Gauldie, J., 1997, Adenovector-mediated gene transfer of active TGF- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung, *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (4), 768-776.
- Skogvall, S., Korsgren, M., Grampp, W., 1999, Evidence that neuroepithelial endocrine cells control the spontaneous tone in guinea pig tracheal preparations, *Journal of Applied Physiology*, 86(3), 789-798.
- Stangelberger, A., Schally, A.V., Varga, J.L., Hammann, B.D., Groot, K., Halmos, G., Cai, R.Z., Zarandi, M., 2005, Antagonists of growth hormone releasing hormone (GHRH) and of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) suppress the expression of VEGF, bFGF, and receptors of the EGF/HER family in PC-3 and DU-145 human androgen-independent prostate cancers, *Prostate*, 64(3), 303-315.
- Stewart, A.G., Thomas, B., Koff, J., 2018, TGF- β : Master regulator of inflammation and fibrosis, *Respirology*, 23(12), 1096-1097.
- Strieter, RM., 2002, Con: Inflammatory mechanisms are not a minor component of the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, 165, 1206-1207.
- Sui, P., Wiesner, D.L., Xu, J., Zhang, Y., Lee, J., Van Dyken, S., Lashua, A., Yu, C., Klein, B.S., Locksley, R.M., Deutsch, G., Sun, X., 2018, Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses, *Science*, 360(6393).
- Sunday, M.E. and Cutz, E., 2000, Role of neuroendocrine cells in fetal and postnatal lung. In: Mendelson CR(Ed), *Endocrinology of the lung. Development and surfactant synthesis*. Humana press Inc. Totowa, NJ, 2000.
- Sunday, M.E., Hua, J., Dai, H.B., Nusrat, A., Torday, J.S., 1990, Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 3, 199-205.
- Sunday, M.E., Hua, J., Reyes, B., Masui, H., Torday, S.J., 1993, Anti-bombesin monoclonal antibodies modulate fetal mouse lung growth and maturation in utero and in organ cultures, *The Anatomical Record*, 236 (1), 25-32.
- Swigris, J.J., Olson, A.L., Huie, T.J., Fernandez-Perez, E.R., Solomon, J., Sprunger, D., Brown, K.K., 2012, Ethnic and racial differences in the presence of idiopathic pulmonary fibrosis at death, *Respiratory Medicine*, 106(4), 588-593.
- Taneyhill, L.A., Coles, E.G., Bronner-Fraser, M., 2007, Snail2 directly represses cadherin6B during epithelial-to-mesenchymal transitions of the neural crest, *Development*, 134 (8), 1481-1490.
- Tejeda-Muñoz, N., González-Aguilar, H., Santoyo-Ramos, P., Castañeda-Patlán, M. C., Robles-Flores, M., 2015, Glycogen synthase kinase 3 β is positively regulated by

protein kinase C ζ -mediated phosphorylation induced by Wnt agonists, *Molecular and Cellular Biology*, 36(5), 731-741.

- Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., Thomas, P.E., 2003, Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12384-12389.
- Tsutsumi, Y., Osamura, R.Y., Watanabe, K., Yanaihara, N., 1983, Simultaneous immunohistochemical localization of gastrin releasing peptide (GRP) and calcitonin (CT) in human bronchial endocrine-type cells. *Virchows Archives A Pathological Anatomy and Histopathology*, 400(2), 163-171.
- Umeda, Y. and Arisawa, M., 1989, Characterization of the calcitonin gene-related peptide receptor in mouse T lymphocytes, *Neuropeptides*, 14 (4), 237-242.
- Vaillant, P., Menard, O., Vignaud, J.M., Martinet, N., Martinet, Y., 1996, The role of cytokines in human lung fibrosis, *Monaldi Archives for Chest Diseases*, 51(2), 145-152.
- Venkatesan, N., Ouzzine, M., Kolb, M., Netter, P., Ludwig, M.S., 2011, Increased deposition of chondroitin/dermatan sulfate glycosaminoglycan and upregulation of β 1,3-glucuronosyltransferase I in pulmonary fibrosis, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 300(2), L191-L203.
- Venkatesan, N., Roughley, P.J., Ludwig, M.S., 2002, Proteoglycan expression in bleomycin lung fibroblasts: role of transforming growth factor beta(1) and interferon-gamma. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 283(4), L806-L814.
- Verckist, L., Pintelon, I., Timmermans, J.P., Brouns, I., Adriaensen, D., 2018, Selective activation and proliferation of a quiescent stem cell population in the neuroepithelial body microenvironment, *Respiratory Research*, 19 (1), 207.
- Vignery, A., Wang, F., Ganz, M.B., 1991, Macrophages express functional receptors for calcitonin-gene-related peptide, *Journal of Cellular Physiology*, 149 (2), 301-306.
- Villa, I., Mrak, E., Rubinacci, A., Ravasi, F., Guidobono, F., 2006, CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway, *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 291(3), C529-C537.
- Vuga, L.J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K. F., Feghali-Bostwick, C., Kaminski, N., 2009, WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(5), 583-589.
- Wang, D., Yeger, H., Cutz, E., 1996, Expression of gastrin releasing peptide receptor gene in developing lung, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 14, 409-416.

- Wang, S., Dang, H., Xu, F., Deng, J., Zheng, X., 2018, The Wnt7b/ β -catenin signaling pathway is involved in the protective action of calcitonin gene-related peptide on hyperoxia-induced lung injury in premature rats, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 23(4), doi:10.1186/s11658-018-0071-7.
- Wang, Y., Liu, J., Chen, J., Feng, T., Guo, Q., 2015, Mir-29 mediates TGF- β 1-induced extracellular matrix synthesis through activation of Wnt/ β -catenin pathway in human pulmonary fibroblasts, *Technology and Health Care*, 23(Supplement 1), S119–S125.
- Warburton, D., Shi, W., Xu, B., 2013, TGF- β -Smad3 signaling in emphysema and pulmonary fibrosis: an epigenetic aberration of normal development? *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(2), L83-L85.
- Weichselbaum, M., Sparrow, M.P., Hamilton, E.J., Thompson, P.J., Knight, D.A., 2005, A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium, *Respiratory Research*, 6:115.
- Westergren-Thorsson G, Hernnäs J, Särnstrand B, Oldberg A, Heinegård D, Malmström A., 1993, Altered expression of small proteoglycans, collagen, and transforming growth factor-beta 1 in developing bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats, *Journal of Clinical Investigation*, 92(2), 632-637.
- Williams, J.A., 2019, *The Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, <https://www.pancreapedia.org/pathways/tgfbeta-smad> [Ziyaret tarihi: 03 Mart 2019].
- Willis, B.C., Liebler, J.M., Luby-Phelps, K., Nicholson, A.G., Crandall, E.D., du Bois, R.M., Borok, Z., 2005, Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 166(5), 1321-1332.
- Wolters, P.J., Collard, H.R., Jones, K.D., 2014, Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis, *Annual Review of Pathology*, 9, 157-179.
- Xia, H., Diebold, D., Nho, R., Perlman, D., Kleidon, J., Kahm, J., Avdulov, S., Peterson, M., Nerva, J., Bitterman, P., Henke, C., 2008, Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *The Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1659-1672.
- Xu Z, Li Z, Liao Z, Gao S, Hua L, Ye X, Wang Y, Jiang S, Wang N, Zhou D, Deng X., 2019, PM2.5 induced pulmonary fibrosis in vivo and in vitro. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 171, 112-121.
- Xu, Y.D., Hua, J., Mui, A., O'Connor, R., Grotendorst, G., Khalil, N., 2003, Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(3), L527-L539.
- Yang, I.V., Burch, L.H., Steele, M.P., Savov, J.D., Hollingsworth, J.W., McElvania-Tekippe, E., Berman, K.G., Speer, M.C., Sporn, T.A., Brown, K.K., Schwarz, M.I., Schwartz,

- D.A., 2007, Gene expression profiling of familial and sporadic interstitial pneumonia, *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 175 (1), 45-54.
- Yang, K., Palm, J., König, J., Seeland, U., Rosenkranz, S., Feiden, W., Rube, C., Rube, C.E., 2007, Matrix-Metallo-Proteinases and their tissue inhibitors in radiation-induced lung injury, *International Journal of Radiation Biology* 83(10), 665-676.
- Yao, I.I., Zhu, J.P., Zhao, Lu, Y., 2006, Losartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats, *Respiration*, 73 (2), 236-242.
- Yilmaz, O., Oztay, F., Kayalar, O., 2015, Dasatinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Growth Factors*, 33 (5-6), 366-375.
- Yule, K.A. and White, S.R., 1999, Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin, *Experimental Lung Research*, 25 (3), 261-273.
- Zhang, L., Keane, M.P., Zhu, L.X., Sharma, S., Rozengurt, E., Strieter, R.M., Dubinett, S.M., Huang, M., 2004, Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis, *Journal of Biological Chemistry*, 279(27):28315-28319.
- Zhang, Z.M., Gu, P., Yi, X.H., Fang, X., Zeng, Y., Zhang, S.X., Zhu, X.Y., Zhang, Y.D., Gu, J., Qiu, W.Z., Zhang, L., 2013, Effects of 1, 25 (OH)2D3 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 36(11), 814-820.
- Zhao, J., Shi, W., Wang, Y.L., Chen, H., Bringas, P. Jr., Datto, M.B., Frederick, J.P., Wang, X.F., Warburton, D, 2002, Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 282(3), L585-L593.
- Zhou, S., Nissao, E., Jackson, I. L., Leong, W., Dancy, L., Cuttitta, F., Vujaskovic, Z., Sunday, M. E., 2013. Radiation-induced lung injury is mitigated by blockade of gastrin-releasing peptide. *The American Journal of Pathology*, 182(4), 1248-1254.

EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Özgecan KAYALAR
Doğum Yeri	Şişli
Doğum Tarihi	09.05.1988
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05537648891
E-Posta Adresi	ozgecankayalar@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2008

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

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

Makale ve Bildiriler	
SCI Endeksli Uluslararası Kitap Bölüm Yazarlığı:	
Oztay, F., Kayalar, O. , Yıldırım, M., Pulmonary Oxidative Stress and Antioxidant Defence System in the Lung Aging, and Fibrotic and Diabetic Lungs, <i>Oxidative Stress in Lung Diseases- Baskıda</i> , Springer 2019.	
SCI-SCI Expanded Endeksli Dergilerde Basılan Makaleler:	
Besiktepe N., Kayalar O. , Erşen E., F. Oztay, The copper dependent-lysyl oxidases contribute to the pathogenesis of pulmonary emphysema in chronic obstructive pulmonary disease patients, <i>Journal of Trace Elements in Medicine and Biology</i> , 44, 247-255, 2017.	
Oztay F., Saçan O., Kayalar O. , Bolkent S., Ipci Y., Kabasakal L., et al., Chard (<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>) extract improved hyperglycemia-induced oxidative stress and	

surfactant-associated protein alterations in rat lungs, *Pharmaceutical Biology*, 53, 1639-1646, 2015.

Yilmaz O., Oztay F., **Kayalar O.**, Dasatinib attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Growth Factors*, 33, 366-375, 2015.

Kayalar O. and Oztay F., Retinoic acid induced repair in the lung of adult hyperoxic mice, reducing transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) mediated abnormal alterations, *Acta Histochemica*, 116, 810-819, 2014.

Oztay F., Bayrak B.B., **Kayalar O.**, Yanardag R., Effects of all-trans retinoic acid on reducing hyperoxia-induced oxidative stress in mice brain, *Nobel Medicus*, 9, 22-26, 2013.

Diğer Uluslararası Alan Endekslerinde Taranan Dergilerde Basılan Makaleler:

Akayli T., Aydin B., Urku C., **Kayalar O.** Diagnosis of *Vibrio anguillarum* in Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Different Methods. *European Journal of Biology* 77 (1), 26-32, 2018.

Gogus E., **Kayalar O.**, Ongen H.G. , Oztay F., "Alterations at the Synthesis and Degradation of E-cadherin in the Human Lungs with Emphysema", *European Journal of Biology*, 76, 61-68, 2017.

Ulusal ve Uluslararası Bildiriler:

Kayalar, O., Ongen, H.G., Oztay, F., 2018, The possible role of gastrin-releasing peptide on pulmonary fibrosis, *European Respiratory Journal*, 52: PA1003; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA1003.

Yıldırım, M., **Kayalar, O.**, Oztay, F., 2018, Effective LncRNAs on myofibroblast differentiation in human A549 cell line treated with TGF-beta. *European Respiratory Journal*, 52: PA990; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA990.

Yıldırım, M., **Kayalar, O.**, Atahan, E., Oztay, F., 2018, Anti-fibrotic effect of Atorvastatin on the lung fibroblasts and myofibroblasts. *European Respiratory Journal*, 52: PA991; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA991.

Yıldırım, M., **Kayalar, Ö.**, Sarı, E., Atahan, E., Öztay, F., Atorvastatinin anti-fibrotik etkisi: Hedef hücreler olarak akciğer fibroblast ve miyofibroblastları, Türk Toraks Derneği 21. Yıllık Kongresi, SS-066, 225.

Kayalar, Ö., Öngen, H.G., Öztay, F., Gastrin serbestleştirici peptidin pulmoner fibrozisteki rolü, Türk Toraks Derneği 21. Yıllık Kongresi, SS-116, 252.

Yıldırım, M., **Kayalar, Ö.**, Öztay, F., İnsan pulmoner fibrozisi üzerinde etkili uzun kodlanmayan RNA'ların in vitro modelde belirlenmesi, Türk Toraks Derneği 21. Yıllık Kongresi, SS-119, 253.

Öztay, F., **Kayalar, Ö.**, Öngen, H.G., Gögüş, E., Pulmoner amfizemde alveolar epitel onarımı ve e-kaderin protein düzensizlikleri, Türk Toraks Derneği 21. Yıllık Kongresi, EPS-049, 462.

- Kayalar, O.**, Yildirim, M., Oztay, F., 2017, The dysregulation of E-cadherin contributes to pulmonary emphysema. *European Respiratory Journal*, 50: PA3931; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA3931.
- Kayalar, Ö.**, Öztay, F., 2017, Kalsitonin geni ile ilişkili peptid insan akciğerinde fibrotik yanıt oluşturur mu? Türk Toraks Derneği, 20.Yıllık Kongresi, Antalya, Türkiye.
- Yildirim, M., Atmaca, Z.E., **Kayalar, O.**, Oztay, F., 2017 Prevention the TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition with atorvastatin in human A549 cell line. *European Respiratory Journal*, 50: PA1024; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA1024.
- Kayalar O.**, Yilmaz O., Oztay F., The effect of dasatinib, a novel tyrosine kinase inhibitor, on the regression of pulmonary fibrosis in mice.", ERS Annual Congress Munich 2014, Münih, Almanya, 6-10 Eylül 2014, vol.44 , pp.3905-3905 .
- Tunalı S., Oztay F., **Kayalar O.** , Yanardag R., Effects Of Vitamin U on Valproic Acid-induced lung injury in rats", III.World Congress of Public Health Nutrition , Kanarya Adaları, İspanya, 9-12 Kasım 2014, pp.123-123
- Oztay F., Bayrak B.B., **Kayalar O.** , Yilmaz O., Yanardag R., Role of all-trans retinoic acid administrations on nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 activation and repair in kidney of hyperoxic mice, 44th IUPAC Word Chemistry Congress and the 47th IUPAC , İstanbul, Türkiye, 11-16 Ağustos 2013
- Kayalar O.**, Bayrak B.B., Oztay F., Yanardag R., All-trans-retinoic acid supplementation is effective to reduce hyperoxia-induced oxidative stress in mice brain.", 22nd IUBMB&37th FEBS Congress "From Single Molecules to System Biology", Sevilla, İspanya, 4-9 Eylül 2012, vol.279, pp.202-202.
- Bolkent S., Oztay F., Saçan O., **Kayalar O.**, Ipci Y., Kabasakal L., et al., "Chard (Beta vulgaris L. var cicla) extract and insulin improved diabetes-induced surfactant protein alterations and oxidative stress in rat lung.", International Symposium on Environmental Impacts, Health Implications and Therapeutic Approaches , Nellore, Hindistan, 15-17 Temmuz 2012, pp.HT87;168-169.
- Kayalar O.**, Oztay F., Retinoic acid-TGF- β 1 crosstalk during alveolar regeneration in hyperoxic mice, 10th ERS Lung Science Conference "Rebuilding a diseased lung: repair and regeneration", Estoril, Portekiz, 30 Mart - 1 Nisan 2012, pp.149; 122.
- Kayalar Ö.** ve Öztay F., Retinoik Asit Hiperoksik Fare Akciğerinde Tgf-Beta 1'in Patolojik Etkilerini Azaltarak Alveolarizasyonu Uyarır", TÜSAD 33. Ulusal Kongresi - "Solunum 2011", İzmir, Türkiye, 15-19 Ekim 2011, cilt.SS-09; 13.

Akademik Başarı ve Tanınırlılık

1. N. Besiktepe, **Ö. Kayalar**, E. Ersen, F. Öztay, "En İyi Uluslararası Yayın Ödülü, Türk Toraks Derneği, Nisan 2018
2. **Ö. Kayalar**, F. Öztay "En İyi Poster Bildiri Ödülü, Türk Toraks Derneği, Nisan 2017
3. E. Atmaca, M. Yıldırım, **Ö. Kayalar**, F. Öztay, "En İyi Sözlü Bildiri Ödülü, Türkiye Solunum Araştırmaları Derneği, Ekim 2016
4. **Ö. Kayalar** TÜBİTAK 1001 Bursiyer, Tübitak, Haziran 2016
5. **Ö. Kayalar** TÜBİTAK 1002 Bursiyer, Tubitak, Kasım 2010
6. **Ö. Kayalar** ERASMUS Bursu, İstanbul Üniversitesi Erasmus Ofisi, Nisan 2013
7. **Ö. Kayalar** Silver Sponsorship, European Respiratory Society (ERS-Paris, Fransa), Eylül 2018
8. **Ö. Kayalar** Silver Sponsorship, European Respiratory Society (ERS-Milano, İtalya), Eylül 2017