

Şeyda DEMİRKOL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE PD1
PDL1 SİNYAL YOLU İLE İLİŞKİLİ KRİTİK GEN
VARYANTLARI VE İLGİLİ GEN ANLATIMLARININ
İNCELENMESİ**

ŞEYDA DEMİRKOL

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Doktora öğrencisi **Şeyda DEMİRKOL** tarafından **Prof. Dr. İlhan YAYLIM**'in danışmanlığında hazırlanan "**Küçük Hücreli Dışı Akeğer Kanseri PDL1 Sinyal Yolu ile İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17/12/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş, ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Akif TURNA
İ.Ü. Cerrahpaşa –CTF Göğüs
Cerrahisi A.D

Jüri

Prof. Dr. Ali Osman GÜROL
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç. Dr. Özlem KÜÇÜKHÜSEYİN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Cem HOROZOĞLU
İst. Gelişim Üni. Tıbbi Hiz ve
Tek.Böl. Tıbbi Lab. Tek. Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Şeyda DEMİRKOL



İTHAF

Hayat yolunda desteğini ailesinden esirgemiyen canım babamın aziz hatırasına
ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı kurucusu, emekli Öğr. Üyesi Prof. Dr. Turgay İsbir'e,

Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı ve doktora tez eğitimimi üstlenen, her zaman kalbinin kapısını bana açık tutan, hayatımın acı tatlı her anında yanımda olan, yaşam boyu birlikte yol yürüyeceğimize inandığım kıymetli ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. İlhan Yaylın'a,

Çalışma örneklerinin sağlanmasında desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocamız Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Akif Turna ve ekibine,

Bilgileri ve destekleyici önerileri ile doktora eğitimim boyunca bana katkıda bulunan Moleküler Tıp Öğr. Üyelerinden kıymetli Doç. Dr. Özlem Küçükhusseyin, Doç. Dr. Canan Cacina, Doç. Dr. Özlem Timirci Kahraman'a ve İstanbul Gelişim Üniversitesi'nden Dr. Öğr. Üyesi Cem Horozoğlu'na,

Dahil olduğum anabilim dalından sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Mehmet Tolgahan Hakan'a, Dilara Sönmez'e, Roya Mashadiyeva'ya, Ebru Nur Ay'a, Aylin/Merve Uzunoğlu'a, Hande Karagedik'e,

Manevi destekleri ile beni ayakta tutan sevgili çekirdek aileme ve akademik süreçte daima arkamda olduğunu hissettiğim kıymetli anneme ve rahmetli babama sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30120

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	i
BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri.....	3
2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Akciğer Kanserinin Etyolojisi.....	6
2.1.3. Klinik Belirtiler	12
2.1.4. Tanı.....	13
2.1.5. Evreleme.....	13
2.1.6. Akciğer kanserinde tedavi	15
2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde İmmünoterapi.....	15
2.3. PD-1/PD-L1 Glikoproteinlerinin Moleküler Yapısı	17
2.4. PD-1/PD-L1 Sinyal Yolağı	18
2.5. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Anti PD-1/PD-L1 Tedavisi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. GEREÇ.....	22
3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması.....	22
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	23
3.1.3. Kullanılan Kitler	24
3.1.4. Kullanılan cihazlar	24

3.1.5. Kullanılan tampon solüsyonları ve çözeltiler	25
3.2. YÖNTEMLER.....	26
3.2.1. Dna İzolasyonu	26
3.2.2. Dna Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	27
3.2.3. PD-1 C/T Gen Polimorfizmlerinin Tespit Edilmesi	27
3.2.4. PD-L1 A/C Gen Polimorfizmlerinin Tespit Edilmesi.....	28
3.2.5. PZR’de Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışı	28
3.2.6. %2’lik Agaroz Jel Hazırlanması.....	29
3.2.7. PD-1 C/TGeni Pzr Ürünlerinde PvuII Enzim Kesimi.....	30
3.2.8. PD-L1 A/C Geni Pzr Ürünlerinde BanII Enzim Kesimi.....	31
3.2.9. PD-L1 A/C ve PD-1 C/T Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi	31
3.2.10. Serum PD-1 Düzeyinin Elisa Yöntemi ile Tayini	33
3.2.11. SDS Page veWestern Blot Analizi ile PD-L1 Protein Analizi	34
4. BULGULAR	39
4.1. PZR Ürünlerinin Kontrolüne Ait Bulgular	39
4.1.1. PD-1 C/T PZR Ürünü ile İlgili Bulgular	39
4.1.2. PD-L1 A/CPZR Ürünü ile İlgili Bulgular	39
4.2. Kesim Ürünlerinin Kontrolüne Ait Bulgular.....	40
4.2.1. Pvu II Enzim Kesimi ile rs2227981 C/T Mutasyon Taraması Bulguları.....	40
4.3. Ban II Enzim Kesimi ile rs2890658 A/C Mutasyon Taraması Bulguları.....	40
4.4. İstatistiksel Analiz Sonucunda Elde Edilen Bulgular	41
4.5. Western Blot Analizine Ait Bulgular.....	51
5. TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR.....	64
FORMLAR.....	74
ETİK KURUL KARARI.....	77
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	82
ÖZGEÇMİŞ	83

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: En sık teşhis edilen kanser türleri ve kansere bağlı ölümler.....	4
Tablo 2.2: Akciğer Kanserinde Belirti Ve Bulguların Sıklığı.....	12
Tablo 2.3: T (tümör boyutuna göre değerlendirme).....	13
Tablo 2.4: N (bölgesel lenf nodu tutulumuna göre değerlendirme).....	14
Tablo 2.5: M (metastaz, uzak organ tutulumun göre değerlendirme).....	14
Tablo 2.6: KHDAK'da hastalığın anatomik 4 evresi.....	15
Tablo 3.1: PZR Karışımının İçeriği.....	28
Tablo 3.2: PD-1 C/T Gen Polimorfizmi PZR Reaksiyon Koşulları.....	29
Tablo 3.3: PD-L1 A/C Gen Polimorfizmi PZR Reaksiyon Koşulları.....	29
Tablo 3.3:PvuII enzim kesimi içeriği.....	31
Tablo 3.4:BanII enzim kesimi içeriği.....	31
Tablo 3.5:Optiblot LDS Sample Buffer Hazırlanması.....	35
Tablo 3.6:%10'luk Separating jel hazırlanması.....	36
Tablo 3.7:%5 Stacking Jel hazırlanması.....	36
Tablo 3.8:1X Transfer Tamponu Hazırlanması.....	37
Tablo 4.1:Çalışma Gruplarına Ait Veriler.....	42
Tablo 4.2: Küçük hücreli dışı akciğer kanser ve sağlıklı kontrollerde PD-1 C/T genotipleri.....	42
Tablo 4.3: Küçük hücreli dışı akciğer kanser ve sağlıklı kontrollerde PD-L1 A/C genotipleri.....	43
Tablo 4.4: PD-1 C/T genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması.....	45
Tablo 4.5: PD-L1 A/C genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.6: Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri.....	47
Tablo 4.7:Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları ve sağlıklı kontrollerde serum PD-1 düzeyleri.....	47

Tablo 4.8: PD 1.5 C/T genotiplerine göre hasta ve kontrollerde PD-1 düzeyleri.....	48
Tablo 4.9: Hastaların patoloji bulguları ve serum PD-1 düzeyleri.....	49
Tablo 4.10: Hastaların patoloji bulguları ve serum PD-1 düzeylerin Genotiplere Göre Dağılımı.....	50
Tablo 4.11: Çalışma Gruplarına Ait PD-1 ve PD-L1 Kombine Genotiplerinin Analizi.....	51
Tablo 4.12: KHDAK Hastalarında Western Blot yöntemi ile protein ekspresyonlarının analizi.....	52
Tablo 4.13:Tümörlü dokularda PD-L1 ekspresyonunun hastaların klinik ve patolojik özelliklerine göre incelenmesi.....	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Akciğer Kanseri Sınıflandırması	3
Şekil 2.2: 2018'de Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanser Olgusu ve Kansere Bağlı Ölüm Oranları	5
Şekil 2.3: 2018'de Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanser Olgusu ve Kansere Bağlı Ölüm Oranları	5
Şekil 2.4: 2012'de 100.000 kişide bir akciğer kanseri görülme sıklığı	6
Şekil 2.5: Sigara içenler ve içmeyenler arasında akciğer kanserinin farklı histolojik özellikleri.....	8
Şekil 2.6: Akciğer kanseri olgularının yaşa ve cinsiyete göre dağılımı.....	9
Şekil 2.7: PD-1-L1 ve B7-CTLA-4 bağlanması ile bloke edilen T lenfosit.....	16
Şekil 2.8: PD-1, PD-L1,CTLA-4 antikor inhibisyonu ile engellenen T lenfosit blokajı.....	17
Şekil 2.9: PD-1/PD-L1 Moleküler Yapısı.....	17
Şekil 2.10: PD-1/PD-L1 Sinyal Yolları.....	19
Şekil 3 1: PD-1.5 C/T Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü.....	32
Şekil 3 2: PD-L1 A/C Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü.....	33
Şekil 4. 1: PD 1 C/T PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	39
Şekil 4. 2: PD-L1 A/CPZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	39
Şekil 4. 3: Pvu II enzim kesim ürünlerinin %2'lük agaroz jeldeki görüntüsü.....	40
Şekil 4. 4: Ban II enzim kesim ürünlerinin %2'lük agaroz jeldeki görüntüsü.....	40
Şekil 4. 5: KHDAK hastaların ve kontrollerde PD-1 C/T genotipleri.....	43
Şekil 4. 6: KHDAK hastaları ve kontrollerde PD-L1 A/C genotipleri.....	44
Şekil 4. 7: KHDAK Hastalarında PD-L1 protein ekspresyonu analizi.....	52
Şekil 4.8: KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta1-4).....	53

Şekil 4. 9: KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 5-8).....	53
Şekil 4. 10: KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 9-12).....	54
Şekil 4. 11: KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 13-16).....	54
Şekil 4. 12: KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 17-20).....	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KHDAK:	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KHAK:	Küçük hücreli akciğer kanseri
SNP:	Tek nükleotit polimorfizmi
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
KT:	Kemoterapi
RT:	Radyoterapi
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
PAH:	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
NNK:	Nitrozamin 4-(metil nitrozamin)-1-(3 piridil)-1- butanon
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
KRAS:	Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homologu
HPV:	Human papilloma virüsün
EBV:	Ebstein bar virüsü
HIV:	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
KOAH:	Kronik obstruktif akciğer hastalığı
LOH:	Heterozigosite kaybı
BRAF:	V-raf murin sarkomu viral onkogen homologu B
ERBB2:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
ALK:	Anaplastik lenfoma kinaz
ROS1:	Proto-onkogen tirozin-protein kinaz 1
MET:	Mezenkimal epitelyal geçiş geni
FGFR1:	Fibroblast büyüme faktörü 1
PZR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
MAPK:	Mitojen aktif protein kinaz

EML4: Ekinoderm mikrotübül benzeri protein 4

TSG: Tümör baskılayıcı gen

RB1: Retinoblastom 1

STK11/LKB1: Serin-treonin kinaz 11

PS: Paraneoplastik sendromlar

TNM: Tümör, nod, metastaz

PD-1: Programlanmış hücre ölüm reseptörü-1

PDL-1: Programlanmış hücre ölüm reseptörü ligandı-1

CRD: Karbonhidrat tanıma domain

CLS: Kolajen benzeri sekans

MMP: Matriks metalloproteinaz

CBP70: Glkolize nükleer lektin

AIP1: Aktin ilişkili protein 1

SMN: Survival motor nöron

snRNA: Küçük nükleer ribonükleik asit

NES: Nükleer export sinyali

ER: Endoplazmik retikulum

PSA: Prostat spesifik antijen

DISC: Ölüm indükleyen sinyal kompleksi

TNF: Tümör nekroz faktörü

TRAIL: Tümör nekroz faktörü ilişkili apoptoz indükleyen ligant

IFN- γ : İnterferon gamma

MUC1: Müsin bileşeni 1

TAM: Tümör ilişkili makrofaj

UTR: Translate olmayan bölge

ELİZA: Enzim bağlı immünabzorbant tahlili

RBL: Eritrosit parçalayıcı tampon çözeltisi

NaOH: Sodyum hidroksit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

NaCl: Sodyum klorür

WBL: Lökosit parçalayıcı tampon çözeltisi

HCl: Hidroklorik asit

SDS: Sodyum dodesil sülfat

OD: Optikal yoğunluk

LD: Bağlantı dengesizliği

MGB: Majör oyuk bağlayıcı

NsSNP: Eş olmayan SNP

TGFbeta: Transforme büyüme faktörü beta

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

TNM: tümör, lenf nodu, metastaz

MHC: Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi

ITIM: immünoresptör tirozin esaslı inhibitör motif

ITSM: immünoresptör tirozin bazlı anahtar motif

DC: dendritik hücre

NK: Doğal öldürücü hücre

LCK: lökosite özgü tirozin kinaz

SHP-1: SH2 domain içeren fosfataz 1

PTPN1: protein tirozin fosfataz nonresptör tip 1

FDA: U.S. Food and Drug Administration

ÖZET

Demirkol Ş. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde PD1 PDL1 Sinyal Yolu İle İlişkili Kritik Gen Varyantları Ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

KHDAK dünya çapında ölümcül kanser türü olarak önemini korumaktadır. Akciğer kanseri tanısı temel olarak her ne kadar histopatolojik analizlere dayanıyor olsa da, yeni tanı ve prognostic biyobelirteçlerin araştırılması her geçen gün önemini artırmaktadır. Bu çalışmada; inflamasyona yanıtta önemli immüno-biyobelirteçlerden olduğunu düşündüğümüz PD-1/PDL-1 moleküllerine ait polimorfizm ve protein analizlerinin KHDAK hastalığına yatkınlık ve klinik parametrelerle olası ilişkisi incelenmektedir. Elde edilen bulgularda hasta ve kontroller arasında PD-1 C/T ve PD-L1 A/C SNP'lerine ait genotip ve allel dağılımları arasında fark gözlenmemiştir. PD-L1 A/C polimorfizmi; AA genotipi taşıma durumu hastalarda kontrollere kıyasla daha yüksek olup, aradaki farklılık anlamlı bulunmuştur ($p=0.043$). PD-1 C/T gen polimorfizmi; anjiyolenfatik invazyon varlığında CC genotipi taşıma durumu anjiyolenfatik invazyon yokluğunda CC genotipi taşıma durumuna kıyasla yüksek olup, aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.028$). Anjiyolenfatik invazyon varlığında CC veya TT genotipi taşıma durumu, anjiyolenfatik invazyon yokluğunda homozigot olma durumuna kıyasla yüksek olup, aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.047$). Perinöral invazyon varlığında CC genotipi taşıma durumu, perinöral invazyon yokluğunda CC genotipi taşımaya kıyasla yüksek bulunmuş olup, aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.026$). Serum PD-1 düzeylerinde; CC genotipi hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p=0.008$). PD-1 ve PD-L1 genotipleri birlikte incelendiğinde, kontrol grubu CTAC kombine genotip taşıma durumu hasta grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuş olup aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0.016$). Ayrıca; tümörlü dokuda PD-L1 molekülü ekspresyon değeri normal dokuda bulunan ekspresyon değeri ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuş olup, “farklılık ilerde derecede anlamlı bulunmuştur” ($p<0.0001$).

Anahtar Kelimeler: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, KHDAK, PD-1, PD-L1, Polimorfizm.

Bu çalışma, “İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi” tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30120

ABSTRACT

NSCLC remains the most deadly cancer type worldwide. However, the diagnosis of lung cancer is mainly based on histopathological analysis, new diagnostic and prognostic biomarkers are still under investigation. In this study, the polymorphism and protein analysis of PD-1 / PDL-1 molecules are examined in terms of susceptibility to NSCLC disease and possible relationship with clinical parameters. There was no difference between the genotype and allele distributions of PD-1 C/T and PD-L1 A/C SNP between the patients and controls. PD-L1 A/C polymorphism; The AA genotype was higher in patients than in controls and the difference was significant ($p=0.043$). For PD-1 C/T gene polymorphism; CC genotype was higher in the presence of angiolymphatic invasion than CC genotype in the absence of angiolymphatic invasion, and the difference was significant ($p=0.028$). CT genotype carrying status was higher in patients without angiolymphatic invasion compared to patients with angiolymphatic invasion and the difference was significant ($p=0.047$). The presence of CC genotype in the presence of perineural invasion was found to be higher than the patients with CC genotype in the absence of perineural invasion and the difference was significant ($p=0.026$). Serum PD-1 levels; CC genotype was found to be higher in patients compared to the control group, and the difference was significantly significant ($p=0.008$). When the PD-1 and PD-L1 genotypes were examined together, CTAC combined genotype carrying in the control group was found to be higher than the patient group and the difference was significant ($p=0.016$). Also; PD-L1 molecule expression value was higher in tumor tissue when compared with normal tissue expression value and the difference was statistically significant ($p<0.0001$).

Key words: Non-small cell lung cancer, NSCLC, PD-1, PD-L1, Polymorphism.

The present work was supported by the “Research Fund of Istanbul University”. Project No. TDK-2018-30120

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, en sık teşhis edilen kanserlerden biridir ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindendir. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere temelde iki gruba ayrılmaktadır. Heterojen bir tümör sınıfı olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK);adenokarsinom, skuamöz hücreli (yassı) karsinom ve büyük hücreli karsinom (farklılaşmamış) alt gruplarını içerirken, yeni akciğer kanseri tanılarının yaklaşık% 85'ini temsil etmektedir[1]. Akciğer kanserlerinin sadece az bir kısmında hastalık yayılmadan tespit edilir; büyük çoğunluğunda tanı geç evrelerde konulabilmektedir. Hastalığın gelişim sebepleri hala tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın sigara kullanımının, çevresel ve genetik faktörlerin bu süreci etkilediği öne sürülmüştür[2].

Günümüzde kanser tedavisi; non-spesifik yöntemlerden, spesifik yöntemlere doğru ilerlemektedir. Radyoterapi, kemoterapi, cerrahi gibi yöntemlerin tedavi için yeterli olmaması ya da vücudun sağlıklı hücrelerine de zarar vermesi nedeni ile immünoterapi kanser tedavisinde önemli seçeneklerden biri olarak öne çıkmıştır. Böylece daha az yan etki görülen, bireye özgü ve daha az toksik bir tedavi şekli mümkün olabilmektedir. Ayrıca konvensiyonel kanser tedavileri ile kombine halde uygulanması ,hastaların hayatta kalma oranlarında anlamlı artışlar sağlamaktadır[3].

Akciğer kanserinde, sağkalımı belirlemede en çok kullanılan yöntem olan TNM (tümör,lenf nodu,metastaz) evrelemesi ve histopatolojik parametrelerin belirleyiciliği kısıtlıdır. Bu kısıtlamalar nedeniyle, TNM evrelemesine ek olarak, tümör çevresi alanlar ve tümöre sızan immün hücrelerin kantitatif değerlendirilmesi de önem arz etmektedir. Artan tümör mikroçevresi anlayışı yeni immün bazlı biyobelirteçlerin incelenmesine ve terapi amacıyla immün yolları hedefleyen yeni ajanların geliştirilmesine olanak vermiştir[4].

Bağışıklık sistemi, transforme olmuş hücrelerin büyümesini engeller ve bunları çoğalıp zararlı hale gelmeden yok edilmesini sağlar. Bu durum kanser immün gözetimi olarak adlandırılır[5]. Kanser immün gözetimi bu görevini karsinogenezisin inhibisyonu ve düzenli hücre homeostazının sürdürülmesiyle sağlar. Bir immün kontrol noktası olarak kabul edilen, Programlanmış Hücre Ölümü Proteini-1 (PD-1), immün yanıtların azaltılmasını ve T hücrelerinin aktivitesini baskılayarakimmün toleransı arttırmada önemli bir rol oynar. PD-1, hem antijene özgü T hücrelerinde apoptoz indüksiyonu hem de regülatör T hücrelerinde apoptozu inhibe ederek otoimmün tepkilere karşı koruma sağlar [6].PD-1'in bilinen

ligandlarına (PD-L1 ve PD-L2) bağlanmasından sonra, aktif bağışıklık hücreleri inhibe edilir. Tümör hücrelerinin yüzeyinde yapısal olarak eksprese olunan programlanmış hücre ölüm ligand 1'in(PD-L1) otoimmün hasarın önlenmesi için periferik dokularda varlığı gereklidir. Yapılan bazı çalışmalarda, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) gibi çeşitli tümör hücrelerinin yüzeyindeeksprese olunan PD-L1 gösterilmiştir vePD-1/PD-L1 eksenini, bağışıklık toleransını korumak ve aynı zamanda bağışıklık evriminde otoimmün hastalıkları önlemek için önemli bir yol olduğu ifade edilmiştir. [7].

Kanser hücresinin büyüme ve çoğalma sürecinde meydana gelen genetik değişikliklerin, konakçı faktörleri ve tümör konakçı etkileşimi (anjiogenez, invazyon, metastaz) sonucunda geliştiği bilinmektedir. Gen polimorfizmlerinin transkripsiyonun başlatılması ve gen aktivasyonunun düzenlenmesine etki ettiği belirtilirken, kanserlerde görülen genetik değişikliklerin, bir nükleotid düzeyinde (tekli ya da çoklu baz değişiklikleri), kromozomal düzeyde (kromozom kayıplar) ya da DNA promotor bölge metilasyonu şeklinde oluşabildiği belirtilmiştir[8][9]. Hem PD-1 hem de PD-L1 polimorfik bölgeleri üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda, PD-1 ve PD-L1 genlerinin polimorfizmleri ile çeşitli kanser riskleri arasındaki ilişki araştırılmıştır ve PD-1 ve PD-L1 genlerine ait genetik değişimlerin sadece hastalığın oluşumuyla ilgili değil aynı zamanda prognoz süreci ile de ilişkili olabileceği bildirilmiştir[10][11].

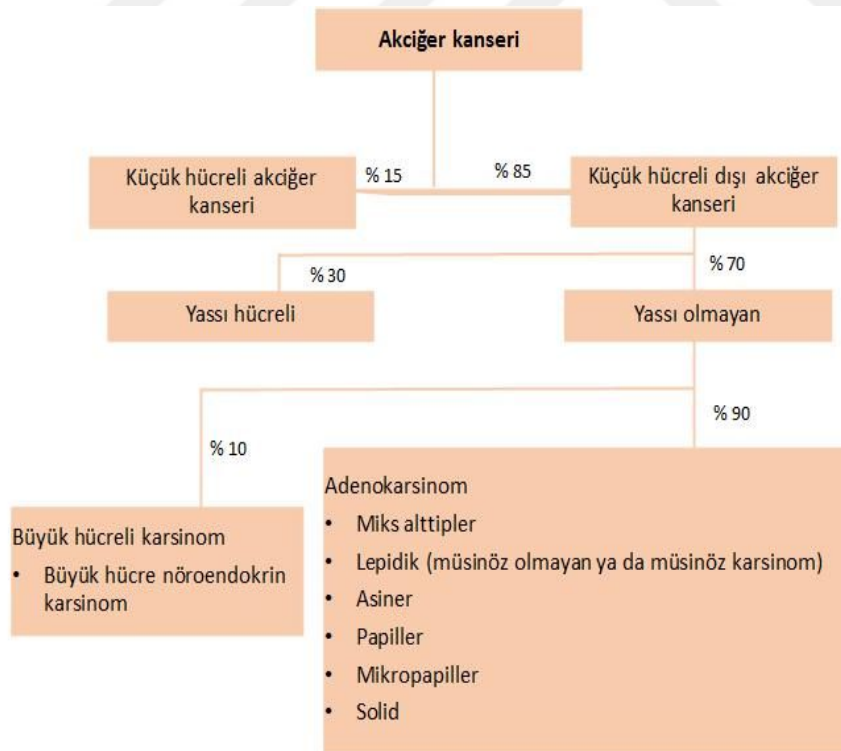
Bu çalışmada önemli immünobiyobelirteçlerden olduğunu düşündüğümüz PD-1/PDL-1 moleküllerine ait polimorfizm ve protein analizlerininKHDAK hastalığına yatkınlık ve klinik parametrelerle olası ilişkisini incelemek istemekteyiz. Elde edilecek bu muhtemel kazanımların KHDAK hastalığı açısından PD-1/PDL-1 ile ilgili moleküler kanser mekanizmaları araştıran literatürlere destek oluşturabileceği kanaatindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Kanser insidansı ve mortalitesi dünya çapında hızla artmaktadır. Birçok sebebe bağlı olarak gelişen hastalık, popülasyonun yaşlanması, nüfusun artması, coğrafi dağılım ve bunun yanı sıra birçok kanser türü için topluma ait sosyoekonomik gelişmeler ana risk faktörlerinin prevalansı ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtır[12][13].

Tüm akciğer kanserli hastaların neredeyse sadece %16'sı tanı konulduktan sonra ≥ 5 yıl yaşamaktadır [14]. Son 10 yılda akciğer kanserinde özellikle taramada vetanıda, tedavide kullanılan minimal invaziv tekniklerde ve hedefe yönelik tedavilerde olmak üzere çok önemli gelişmeler ortaya çıkmıştır [15]. Akciğer kanserinin kesin histolojik alt tipinin tanımlanması (Şekil 2.1), histolojik alt tiplere özel terapötik maddelerin artması nedeniyle son birkaç yılda daha önemli hale gelmiştir [16].



Şekil 2.1: Akciğer Kanseri Sınıflandırması[17]

2.1.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi

Dünya genelinde akciğer kanseri,2018 yılı verilerine göre neredeyse 2.1 milyon yeni akciğer kanseri vakası ve 1.8 milyon kansere bağlı ölümle birlikte, kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Tablo 1)[18].

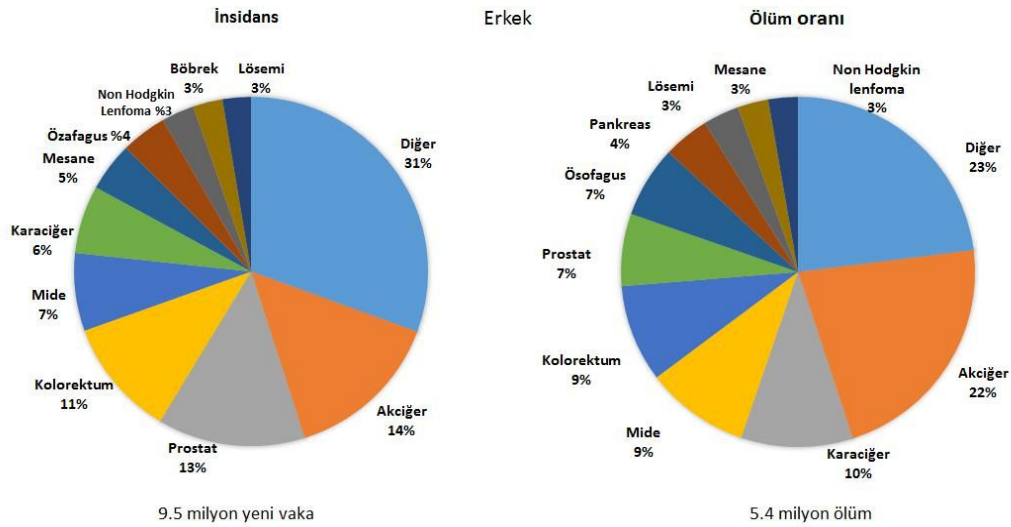
Tablo 2.1: En sık teşhis edilen kanser türleri ve kansere bağlı ölümler[18]

Kanser Türü	Yeni Teşhis	Kansere Bağlı Ölüm
1. Akciğer	2,093,876 (%11.6)	1,761,007 (%18.4)
2. Meme	2,088,849 (%11.6)	626,679 (%6.6)
3. Prostat	1,276,106 (%7.1)	358,989 (%3.8)
4. Kolon	1,096,601 (%6.1)	551,269 (%5.8)

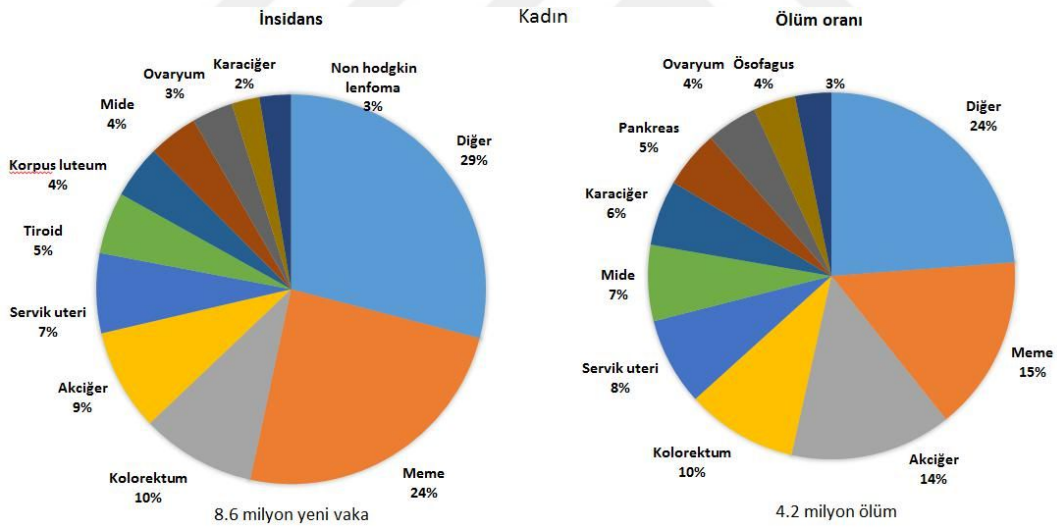
Her iki cinsiyette bir arada incelendiğinde, akciğer kanseri en sık tanı alan kanserdir (toplam vakaların% 11.6'sı) ve kanser ölümünün önde gelen nedenlerindendir (toplam kanser ölümlerinin% 18.4'ü) (Tablo 1).

Cinsiyetlere göre ayrı ayrı bakıldığında erkeklerde, akciğer kanseri en sık teşhis edilen kanser tipidir ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer alır. Ardından prostat kanseri ve kolorektal kanser sıklıkla teşhis edilirken,kansere bağlı ölümlerde karaciğer ve mide kanserinin erkeklerde mortalitesi yüksektir (Şekil 2.2).

Kadınlar arasında meme kanseri en sık tanı alan kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir (Şekil 2.3). Kolorektal kanser ve akciğer kanseri de kadınlar da hem mortalite hem de teşhiste önemli bir yere sahiptir.



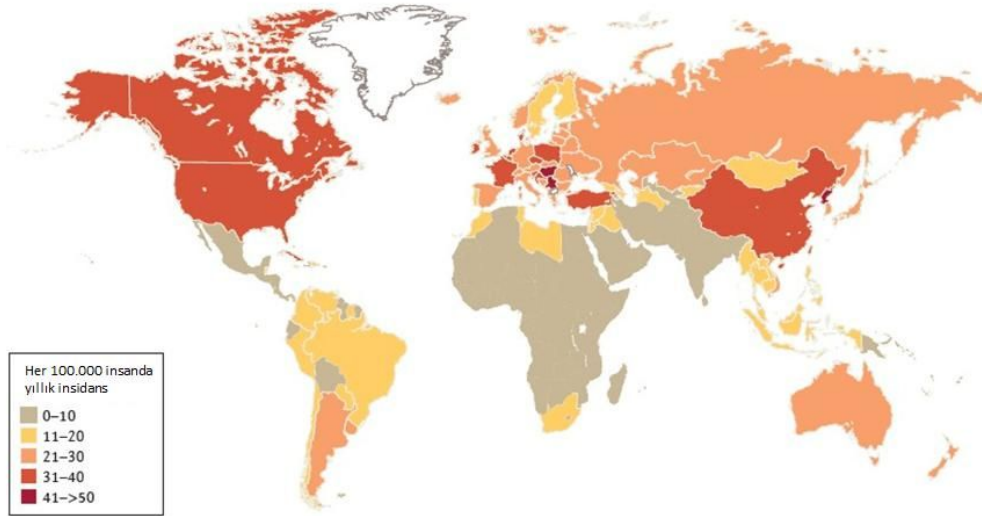
Şekil 2.2: 2018'de Erkeklerde En Sık Görülen 10 Kanser Olgusu ve Kansere Bağlı Ölüm Oranları [18]



Şekil 2.3: 2018'de Kadınlarda En Sık Görülen 10 Kanser Olgusu ve Kansere Bağlı Ölüm Oranları [18]

Dünya genelinde, tüm kanserler türleri için görülme oranı bölgeler arasında farklılık göstermekle beraber; erkeklerde kadınlardan da yaklaşık % 20 daha yüksek olarak tespit edilmiştir [18]. Gelişmiş ülkelerde akciğer kanseri görülme sıklığı azalmakla birlikte, dünyanın daha az gelişmiş bölgelerinde (Afrika, Güney Amerika, Doğu Avrupa ve Çin) görülme oranları artmaktadır. Bu bulgu için olası bir açıklama, bu ülkelerin daha az sigara içiciliğine sahip olmaları önerisinde bulunmaktadır. Bununla birlikte, erkeklerde en yüksek

akciğer kanseri görülme oranları Kuzey Amerika, Avrupa, Doğu Asya, Arjantin ve Uruguay'da ve en düşük oranlar Sahra altı Afrika civarında tespit edilmiştir (Şekil 2.4)[19].



Şekil 2.4 :2012'de 100.000 kişide bir akciğer kanseri görülme sıklığı[20].

2.1.2. Akciğer Kanserin Etyolojisi

Akciğer kanserinin oluşumunda var olan risk faktörleri tek bir sebebe bağlanamazken; genetik faktörler, çevresel faktörler ve yaşlanma genel risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Çevresel faktörler arasında; fiziksel karsinojen (ultraviyole ve iyonizan radyasyon), kimyasal karsinojenler (asbest, sigara dumanı bileşenleri, aflatoxin (gıda), arsenik (su), biyolojik karsinojenler (virus, bakteri, parazit) sayılabilmektedir. Kansere bağlı ölümlerin 1/3'ünün; beden kütle indeksi (BKİ), meyve ve sebze alımı, fizik aktivite, tütün kullanımı, alkol kullanımı gibi risk faktörlerine bağlı olduğu bildirilmiştir. Fakat klinik olarak yararlı risk faktörleri sınıflandırması sağlamak için yeterli değildir. Akciğer kanseri riski ve erken teşhis için umut veren biyobelirteçlerin tanımlanması ve beraberinde geniş klinik uygulaması umut verici tanı ve tedavi hedefleri olarak nitelendirilmiştir[21].

2.1.2.1. Sigara Kullanımı

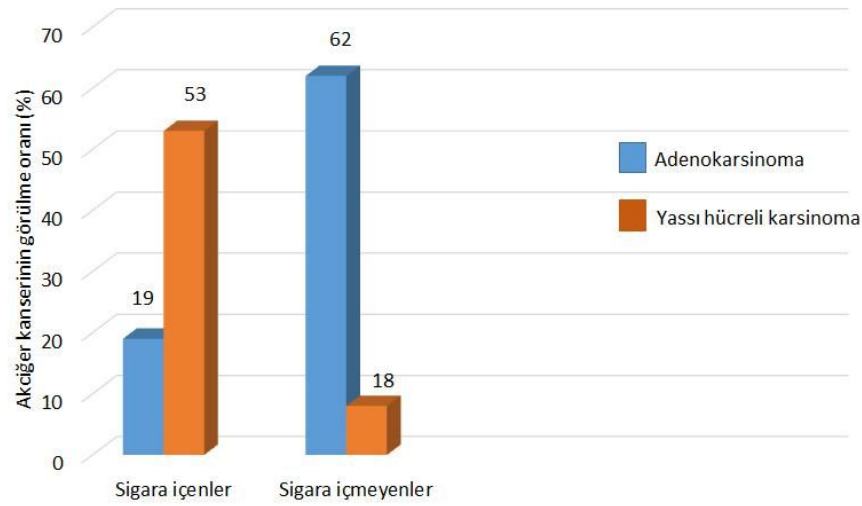
Aşırı ve uzun süreli tütün kullanımı akciğer kanserinin oluşmasında önemli bir risk faktörü olduğu belirtilirken, araştırmacılar sigara içmeyenlerde akciğer kanseri görülme

sıklığının düşük olduğunu belirtmişlerdir. Sigara kullanımının bırakılmasını takiben karsinomun klinik başlangıcının 10 yıla kadar ertelenebildiği gösterilmiştir. Sigaraya başlama yaşı, sigara içme süresi, içilen sigara sayısı ile tütün ve sigara tipi (filtreli, filtresiz, puro, düşük tar ve nikotin içeriği vb.) akciğer kanseri gelişme riskini etkilemektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan başka bir çalışmada yayınlanan rapora göre “sigara içiminin akciğer kanserinin başlıca nedeni olduğu sonucu tekrar tekrar vurgulanmıştır [22,23].

Sigara dumanı, gaz halindeki ve parçacık halindeki bileşiklerden oluşan kompleks bir aerosoldür. Tütün bağımlılığının temel belirleyicisi nikotin ve nikotinin su alındıktan sonra sigara dumanının toplam partikül maddesi olan katrandır. Katran maruziyeti, akciğer kanseri riskinin önemli bir bileşeni gibi görünmektedir [24]

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), tütün dumanında en az 50 farklı kanserojen tanımlamıştır. NNK (4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1-butanone) gibi tütün kanserojenleri, DNA'ya bağlanabilir ve sigara dumanındaki PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) gibi kansere neden olan bir kimyasal maddeye kovalent olarak bağlanan hatalı DNA parçaları oluşturabilir. DNA tamir mekanizmaları tarafından bu DNA eklentileri onarılabılır ama olası bir hata kalıcı bir mutasyon oluşmasına sebebiyet verebilir. Sonuç olarak, NNK'ler, kontrolsüz hücresel proliferasyon ve tümörijenезi ile sonuçlanabilecek kritik onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin modülasyonunu içeren bir dizi sinyal yolu aktivasyonuna aracılık edebilirler [25].

Her ne kadar tüm histolojik akciğer kanseri tipleri sigara içiciliği ile ilişkili olsa da, sigara içenlerde KHAK (küçük hücreli akciğer kanseri) ve skuamöz hücreli karsinom tipi için bu ilişki daha güçlüdür. Buna karşılık, akciğer adenokarsinomu sigara içmeyenlerde daha yaygın tespit edilmiştir [26]. Adenokarsinom sigara kullanımı olmayan, genellikle aile öyküsü olan genç hastalarda sık teşhis edilen akciğer kanseri türü haline gelmektedir[27] (Şekil 2.5).

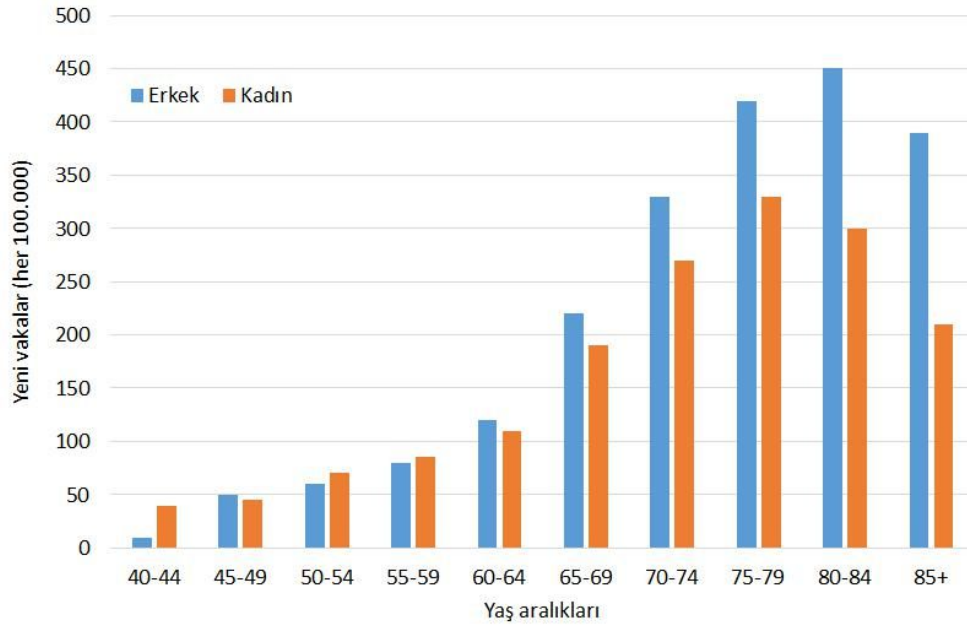


Şekil 2.5: Sigara içenler ve içmeyenler arasında akciğer kanserinin farklı histolojik özellikleri

2.1.2.2. Yaş, Cinsiyet, Irk

Gelişmiş ülkelerdeki çoğu nüfusun yaş ortalaması artmaktadır ve kanser yaşlıların bir hastalığı haline gelmektedir. Her ne kadar sigara içme sıklığı 65 yaş ve üstü kişilerde (% 9,3) 18 ila 24 yaşları arasında (% 21,4), 25 ila 44 yaşları (% 23,7) ve 45 ila 64 yaşları arasında (%22,6) ile en düşük olsa da akciğer kanserli hastaların % 65'inden fazlası 65 yaşından daha büyüktür [28]. Spesifik olarak, akciğer kanserli hastaların% 31.1'i 65 ila 74 yaş arasında,% 29'u 75 ila 84 yaş arasında ve% 8.3'ü yaş ve üstüdür.Tanı sırasındaki ortalama yaş 70'in üzerindedir (Şekil 2.6) [29]

Akciğer kanseri için 5 yıllık sağkalım oranı her iki cinsiyet için yaşla birlikte azalmaktadır. Son yapılan çalışmalar göre; özellikle fonksiyonel kendine yetebilen yaşlı hastaların, erken evre hastalıkları için cerrahi tedavi ve ileri hastalıklar için genç hastalar için kullanılan cerrahi tedavi ve kemoterapidendaha fazla faydalanabileceği sonucuna varılmıştır [30].



Şekil 2.6: Akciğer kanseri olgularının yaşa ve cinsiyete göre dağılımı[31].

1980'lerin sonlarında kadınlarda kanser ölümünün önde gelen nedeni olarak bilinen meme kanseri oranlarını aşan akciğer kanseri, günümüzde kadınlarda meme kanserine kıyasla 2 kata daha fazla kansere bağlı ölümlerin yaşanmasına sebep olduğu istatistiksel olarak bilinmektedir [32]. 1950'den bu yana kadınlarda akciğer kanserine bağlı ölüm oranlarında %600'den fazla bir artış olmuştur.

Sigara kullanımı 1920'lerde doğan erkeklerde II. Dünya Savaşı sırasında en yüksek seviyeye ulaşırken, Amerika Birleşik Devletleri ve Batı Avrupa'da kadınlarda sigara içme alışkanlığı; ikinci dünya savaşı sonrası 1930'lar da yaklaşık 10 yıl sonra hız kazanmıştır. Yeni nesil gençliğin daha az sigara içmesi gerçeği ile, akciğer kanserine bağlı ölümlerinin her iki cinsiyette de düşmeye devam etmesi beklenmektedir. Sigara içme sıklığı erkeklerde (% 23,1) ile kadınlardan (% 18,3) daha fazladır. Her ne kadar genel olarak akciğer kanseri görülme sıklığı erkeklerde kadınlardan daha yüksek olsa da, erkeklerde görülen akciğer kanseri insidansındaki düşüş nedeniyle cinsiyetler arası bu farklılıkgünden güne azalmaktadır.

ABD ve Japonya'da histopatolojik olarak en sık adenokanser tipi akciğer kanseri saptanırken, Asya ülkelerinde skuamöz hücreli kanser hala en sık teşhis edilen kanser tipidir. [33]. Ülkemizde en sık skuamöz hücreli akciğer kanseri (yaklaşık % 45) görülürken, bunu

benzer oranla küçük hücreli kanser ve adenokanser tipi akciğer kanseri izlenmektedir. Büyük hücreli akciğer kanseri ise % 2 oranıyla en az görülen kanser tipidir [34].

2.1.2.3. Meslek ve Çevre

Mesleki ajanlar ve maruz kalma koşulları dahil olmak üzere mesleki maruziyetler, akciğer kanseri etiyojijisinde önemli bir rol oynamaktadır. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), akciğer kanseri ile ilişkili 28 madde /çalışma durumunu / mesleği listelemiştir [35]. Bölgelerdeki birçok ülkenin ekonomisine ilişkin; hematit madencilijii, demir ve çelik dökümhaneleri, alüminyum üretimi, kok üretimi, karbon elektrot üretimi, boya ve kauçuk üretimi gibi ağır metal endüstriiile ilişkili meslek grupları akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Belirlenen kimyasalların bazılarında akciğer kanseri riskindeki artış sebebi olarak polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruziyet gösterilmiştir. Ayrıca; asbeste, silika tozuna veya formaldehit'e maruz kalmış olmak, akciğer kanserine yakalanma riskiyle pozitif olarak ilişkilendirilmiştir[36, 37].

Çeşitli ülkelerden derlenen bilgilere dayanarak, IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı) hava kirliliğini ve dış hava kirliliğindeki partikül maddelerini insanlar için kanserojen olarak sınıflandırmıştır [38]. Yapılan bir meta-analizden elde edilen sonuçlara göre 10 mikrondan daha az çapa sahip partiküler madde ile akciğer kanserine yakalanma riski arasındapozitifbir ilişki olduğuna dair kanıtlarlar ortaya konmuştur [39].

İçme sularında arsenik konsatrasyonunun artmasıda yine, akciğer kanserinde ki artış ile ilişkilendirilmiştir. Uranyum topraklarının ve kayalarınındoğal olarak parçalanmasıyla oluşan radyoaktif bir gaz olan Radon'a maruz kalmanın, akciğer kanseri için yine bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir [40].

2.1.2.4. Diyet

Dünya Kanser Araştırma Fonu verilerine göre; karotenoid içeren meyve ve yiyeceklerin muhtemelen akciğer kanserine karşı koruduğı ve sınırlı sayıda veriler ışığında kırmızı et, işlenmiş et, toplam yağ, tereyağı ve farmakolojik dozların (sadece sigara içenlerde) ve düşük vücut yağ seviyelerininakciğer kanserinin nedenleri arasında olduğu ileri sürülmüştür [41].

Vitamin E ve selenyum da antioksidan etkisiyle akciğer kanserine yakalanma riskini azaltmaktadır. Yüksek yağlı diyetle beslenen sigara tiryakilerinde akciğer kanseri riskinin

arttığı gösterilmiştir. Çay (özellikle yeşil çay) tüketiminin de hastalığa karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir [42].

2.1.2.5. Sosyoekonomik Durum

Akciğer kanserinde sosyoekonomik durum, farklı sosyoekonomik statüdeki insanlar arasında sigara içme, mesleki ve çevresel maruziyet, hava kirliliği ve diyet faktörleri arasındaki farklılıkları yansıtmaktadır. Bu nedenle, akciğer kanseri görülme sıklığı ve kansere bağlı ölümlerdeki sosyoekonomik farklılıklar, sigara içme sıklığının altta yatan farklılıklarını gözler önüne sermektedir [43]. Düşük sosyoekonomik statü dünya genelinde tüm kanserler gibi, akciğer kanserinde de tanı sürecini ve sonraki aşamaları etkilemektedir. Eğitimsiz yada düşük gelir grubuna sahip topluluklarda hastalık daha fazla görülmektedir [44].

2.1.2.6. Genetik

Akciğer kanseri, birçok ülkede kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebebidir. Sigaradan kaçınma stratejilerinin yanı sıra, akciğer kanseri etiyolojisinde yer alan biyolojik yolların anlaşılmasına prediktif, prognostik veya tanısal değeri olabilecek, hastalığı tedavi etmek için veya yeni tedavilerin geliştirilmesi için kilit biyomoleküllerin tanımlanması için gereklidir.

Tüm insan tümörleri gibi akciğer kanserleride, DNA sekansındaki veya ekspresyonundaki anormalliklerden kaynaklanabilir. Günümüzde, NSCLC (küçük hücreli dışı akciğer kanseri) çoklu onkogenlerde meydana gelen “sürücü” mutasyonları ile sınıflandırılmaktadır [45][46]. Bununla birlikte, tümörde gelişen somatik mutasyonlardan bağımsız olarak germ hattındaki tek nükleotid polimorfizmlerine (SNP'ler) bağlı akciğer kanserinde oluşan genetik duyarlılığa araştırmalarda büyük ilgi gösterilmektedir [47][48]. Bu sonuçlardan yola çıkarak karsinogenez ve riskleri belirlemede doku bazlı moleküler teknikler (ör; DNA metilasyonu, RNA transkripsiyonu, vs.) ve non-invaziv parametreler (PZR tekniği ile) kullanılmaktadır.

Akciğer kanserinde kalıtsal özellikler ve aile öyküsü son 60 yılda art arda rapor edilmiştir. Hastalık gelişiminin moleküler mekanizmasının anlaşılmasında kalıtsal faktörlerin bir temel oluşturabileceği gösterilmektedir. Sigara içen TP53 germline mutasyonları taşıyan olgularda, sigara içmeyenlere oranla artmış akciğer kanseri riski tespit

edilmiştir. Benzer şekilde ; epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) T790M sekans varyasyonunununalede çoklu NSCLC yakalanma riskini artırdığı bildirilmiştir [48].

2.1.3. Klinik Belirtiler

Teşhis süreci genellikle hastanın şüpheli semptom ve bulguları ifadesiyle başlar. Klinik belirtiler genelde hastalığın evresiyle paralel olup, akciğer kanserli hastaların %75'inde öksürük, göğüs ağrısı, hemoptizi, kilo kaybı, yutkunma güçlüğü, hırıltılı solunum ve dispne gibi klinik bulgular kendini göstermektedir. Diğer belirtiler arasında superior vena cava sendromuna bağlı üst göğüste venöz tıkanıklık, kolun ulnar yönü ile birlikte omuz ağrısı ve önkolda ağrı yer alan diğer şikayetler arasındadır [49].

Tablo 2.2 :Akciğer Kanserinde Belirti Ve Bulguların Sıklığı[50]

Yakınma ve Bulgular	Görülme sıklığı (%)
Öksürük	75
Kilo kaybı	68
Nefes darlığı	58- 60
Göğüs ağrısı	45- 49
Ağızdan kan gelmesi	29- 35
Kemik ağrısı	25
Çomak parmak	20
Ateş	15- 20
Kuvvetsizlik	10
Vena kava superior sendromu	4
Yutma güçlüğü	2
Wheezing, stridor	2

Primer tümör, tümörün bölgesel yayılımı, toraks dışı metastazlar ve paraneoplastik sendromlara bağlı olarak hastalığa bağlı şikayetler ve fiziki m uayene bulguları değişmektedir [51].

2.1.4. Tanı

Genellikle, KHDAK ileri evre hastalık mevcut olana kadar teşhis edilmemektedir. Genellikle hastaların farklı şikayetleri sırasında yapılan tetkiklerde ortaya çıkmaktadır. Teşhis, histolojik doğrulama için biyopsi gerektirmektedir. Tanı ayrıca TNM evrelemesi gerektirir, kanser tedavisine rehberlik edecek olan tümörün boyutunun belirlenmesini bu süreçte önem arz etmektedir. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ile kombine edilen bilgisayarlı tomografi (CT/BT), geleneksel invaziv evrelemeye kıyasla (mediastinoskopi ve mediastinal lenf nodu biyopsisi ile ekoendoskopi) daha iyi bir N evre tanısının konmasını sağladığı bildirilmiştir. İleri evre olgularda ise “floresan bronkoskop kullanılarak yapılan incelemeler daha umut verici” bulgular ortaya koymaktadır. “Balgam sitolojisi, bronkoskopi, transtorasik iğne aspirasyonu (TTİA), torasentez ve plevra biyopsisi” yaygın olarak kullanılan diğer tanısal yöntemlerdir[52].

2.1.5. Evreleme

Akciğer kanserine ait tanı sonrası evrelemede; tümöre ait büyüklük, akciğerden lenf noduna yada diğer organlara olan invazyonunun değerlendirildiği TNM (tümör, lenf nodu, metastaz) evreleme sistemi kullanılmaktadır. T faktörüne göre primer tümörün özellikleri dikkate alınarak değerlendirme yapılmaktadır (Tablo 2.3-4-5).

Tablo 2. 3: T (tümör boyutuna göre değerlendirme)

Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor, balgam veya bronş yıkamada malign hücreler olmasına rağmen bronkoskopi ve görüntülemede tümör görüntülenemiyor
T0	Primer tümöre ait belirti yok
Tis	Karsinoma insitu
T1	Tümör en büyük çapı ≤ 3 cm, akciğer veya viseral plevra ile çevrili, bronkopik olarak lob bronşundan daha proksimale (ana bronşa) invazyon göstermeyen tümör T1a: Tümör en büyük çapı ≤ 2 cm T1b: Tümör en büyük çapı > 2 cm fakat ≤ 3 cm
T2	Tümör en büyük çapı > 3 fakat ≤ 7 cm ya da; ana bronşa invaze ve ana karinaya uzaklığı ≥ 2 cm, visseral plevraya invaze, hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni T2a: Tümör en büyük çapı > 3 fakat ≤ 5 cm T2b: Tümör en büyük çapı > 5 fakat ≤ 7 cm
T3	Tümör > 7 cm veya göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), mediastinal plevra, diyafragma, frenik sinir, paryetal perikard yapılarından birine invaze ya da ana karina tutulumu olmadan ana karinaya uzaklık < 2 cm ya da bütün bir akciğeri kaplayan atelektazi veya obstrüktif pnömoni ile birlikte olan tümör ya da aynı lobda farklı bir nodül olması
T4	Tümör herhangi bir boyutta ve beraberinde; mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir,özofagus, vertebra korpusu ve ana karina yapılarından birine invazyon ya da aynı taraf akciğerde farklı bir lobda nodül.

Bu evrelemeler tedavi planının en önmeli belirteçlerindendir. 2017 yılında kullanılmaya başlanmış olan 8. TNM evreleme sistemi için; 1999-2010 yılları arasında prospektif olarak 94 708 hastadan oluşan yeni bir veri tabanı kullanılmıştır ve çalışmaya Avrupa ülkeleri, Asya ülkeleri, Kuzey Amerika, Avusturalya ve ülkemizden hastalar dahil edilmiştir[53][54].

Tablo 2. 4: N (bölgesel lenf nodu tutulumuna göre değerlendirme)

Nx	Bölgesel lenf bezlerinin değerlendirilememesi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı taraf peribronşiyal ve/veya aynı taraf hiler lenf bezlerine metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerinin tutulması
N3	Karşı taraf mediastinal, hiler; aynı veya karşı taraf supraklaviküler veya skalen lenf bezlerinin tutulması

Tablo 2. 5: M (metastaz, uzak organ tutulumun göre değerlendirme)

M	Uzak metastaz varlığının değerlendirilememesi
M0	Uzak metastaz olmaması
M1a	Primer tümör ile farklı lobda satellit nodül olması. Plevral, perikardiyal malign sıvı ya da nodül olması
M1b	Uzak organ metastazı

TNM sisteminin yeniden geliştirilmesi ile de KHDAK'lı hastalar, yapılacak tedavi ve prognoz yönünden evre IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklinde sınıflara ayrıştırılmıştır [55]. Özet olarak; KHDAK'da hastalığın anatomik 4 evresi vardır aşağıda açıklandığı gibi belirlenir:

Tablo 2.6 : KHDAK'da hastalığın anatomik 4 evresi

Evre 1: Tümör akciğerin sadece küçük bir bölümüne yerleşmiştir ve herhangi bir lenf bezesine henüz yayılma göstermemiştir.
Evre 2: Hastalık en yakın lenf bezelerine yayılmıştır veya lenf bezlerine yayılmadan önce göğüs kafesi, diyafram, akciğer veya kalp etrafındaki zara atlamıştır.
Evre 3: Tümör iki akciğer arasındaki mediasten denilen boşluğa veya buradaki lenf bezelerine yayılmıştır veya akciğer zarı, göğüs kafesi veya diyafram tutulumu ile birlikte lenf bezi yayılımı göstermiştir.
Evre 4: Tümör uzak organlara veya diğer akciğere yayılmıştır veya akciğer zarları veya kalp zarları arasında sıvı toplanmasına sebep vermiştir.

2.1.6. Akciğer kanserinde tedavi

Akciğer kanserinde tedavi, akciğer kanseri alt tipleri ve hastalığın evresine göre cerrahi, KT (ilaçla tedavi), RT (ışın tedavisi) seçeneklerinin bazıları ya da tümü hastanın veya hastalığın özelliğine göre uygulanabilir. Bu tedavilerdeki amaç hastalığı mümkün oldukça ortadan kaldırmak, mümkün değilse sınırlamak, sağkalımı uzatmak ve en önemlisi hastanın yaşam kalitesini arttırmaktır. Hastanın yaşam kalitesini yükseltmeyi amaçlayan destek tedavisi, tanıdan ölüme kadar geçen sürede hastaya yapılan optimal ağrı tedavisi, dengeli beslenme, psiko-onkolojik bakım ve sosyomedikal yardımların toplamıdır. Bu nedenle, destek tedavisi sadece semptom ortaya çıkınca başvurulacak değil, tüm hastalık süresince yapılması gereken bir tedavi şeklidir [56].

2.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde İmmünoterapi

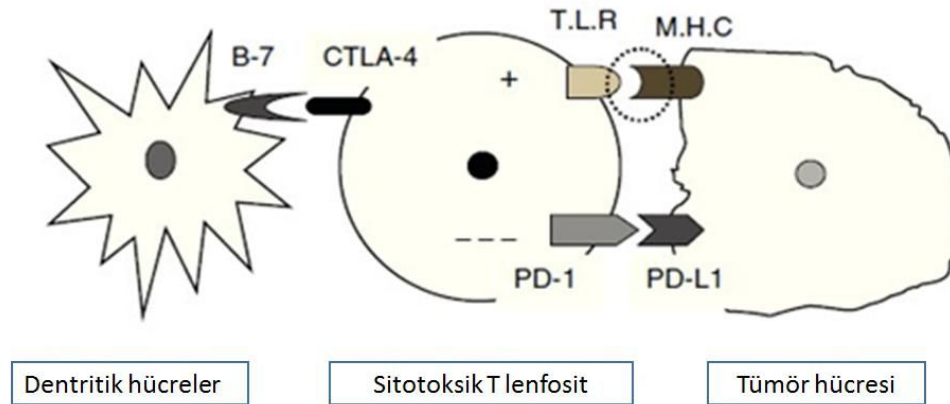
Son yıllarda Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanser (KHDAK) tedavisine umut verici bir yaklaşım olarak immünoterapinin gösterilmesi akciğer kanseri tedavisi tarihindeki en yeni gelişmelerden biridir. Kanser tedavisinde immünoterapi üzerine yapılan çalışmalar özellikle spesifik immün düzenleyici kontrol noktalarını hedef alan ve endojen antitümör immün tepkisinin artırılmasını hedef alan yeni immünoterapi ilaçlarının geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır [57]. Bağışıklık sistemi doğuştan (hızlı bir efektör işlevi uygulayan miyeloid ve lenfoid hücreler) ve sonradan kazanılan (düzenleyici CD4 ve sitotoksik CD8 T hücreleri dahil olmak üzere B ve T lenfositleri) olarak ayırt edilebilir. Bağışıklık sistemi aktifleştirici

ve engelleyici sinyaller arasındaki hassas dengeyi, yabancı antijenleri eksprese eden hücrelerin hızlı bir şekilde imha edilmesi ve aynı zamandanormal dokuların korunması şeklinde ifade eder. Düzenleyici T hücreleri (Treg'ler), immünoşüpresif sitokinler ve sitotoksik T-lenfosit antijeni 4 (CTLA-4) ve programlanmış hücre ölüm proteini-1 (PD-1) dahil olmak üzere immün kontrol noktaları ana inhibitör kuvvetlerdir.

KHDAK, tümörle ilişkili antijenlerin immün modülasyonu, Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi (MHC) antijen ekspresyonu kaybı, olgunlaşmamış dendritik hücrelerinde artış, doğal T-hücrelerinde azalma, CD4 / CD8 T-hücre oranlarında azalma ve T hücrelerinin baskılanmasını artırmak için CD8+T hücrelerinde PD-1 aşırı ekspresyonugibi pro-tümörjenik immünoşüpresif değişikliklerin indüklenmesi yoluyla immün sistemi atlar[58].

CTLA-4 ve PD-1, söz konusu ana inhibitör kontrol noktası yollarından ikisidir. CTLA-4 bağışıklık tepkisinin erken safhalarında etki eder ("primer faz") ve lenf nodlarındaki kendi antijenlerine karşı T hücresi tepkisinin başlamasını sınırlandırırken; PD-1 yolu ise efektör fazdaki tümör mikroçevresinde anahtar rol oynar ve devam etmekte olan T-hücresi aktivitesini sınırlandırmaktadır. Bu sistemler, tümörün büyümesini ve çoğalmasını desteklemek ve bağışıklık tepkisini azaltmak için gereklidir.

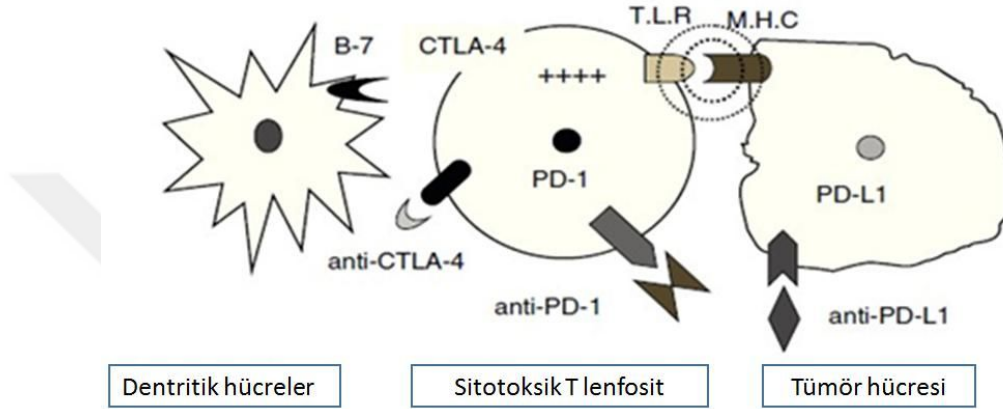
CTLA-4, CD28 ile önemli bir homoloji paylaşan ve aynı ligandları (B7.1 ve B7.2) bağlayan aktif T hücrelerinin yüzeyi üzerinde eksprese olan inhibitör bir reseptördür. CTLA-4'ün antijen sunan hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen bu ligandlara rekabetçi bağlanması, CD28 kaynaklı T hücre aktivasyonunu uyaran sinyallere karşı etkisiz kılar (Şekil 2.8).



Şekil 2.7 : PD-1-L1 ve B7-CTLA-4 bağlanması ile bloke edilen T lenfosit[59].

İmmün kaçıştan sorumlu olan diğer bir negatif ve inhibe edici bir sinyal, PD-1'in PD-L1 ve PD-L2 moleküllerine bağlanmasıyla da türetilir (Şekil 2.9). CTLA4 ve PD-1'in

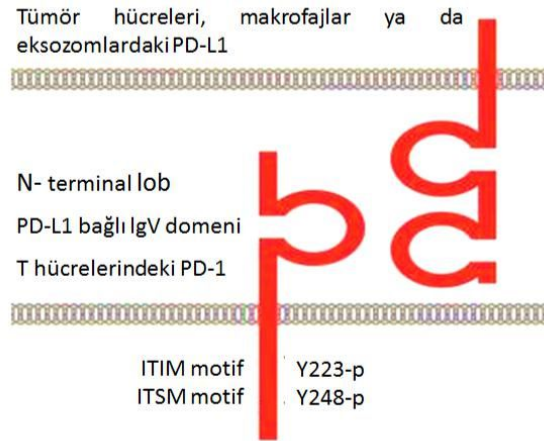
ligandlarına bağlanmasının inhibe edilmesiyle, T hücrelerinin tümör infiltrasyonu ve tümör gerilemesi ile sonuçlanan artmış T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalması gözlenebilmektedir [60]. Bu bulgulara dayanarak, son zamanlarda, PD-1 ve PD-L1 arasındaki etkileşimi inhibe eden ajanların geliştirilmesi, kanser hastalarının tedavisinde umut verici bir gelişme olarak görülmüştür.



Şekil 2.8 :PD-1, PD-L1,CTLA-4 antikor inhibisyonu ile engellenen T lenfosit blokajı [58].

2.3. PD-1/PD-L1 Glikoproteinlerinin Moleküler Yapısı

CD279 olarak da adlandırılan PD-1 ilk olarak 1992'de tanımlanmıştır. PD-1 kodlayan gen (*pdc1*), 2. Kromozom üzerinde yer almaktadır. B7-CD28 süper ailesinin bir üyesi olarak olan PD-1, CD28 amino asit dizisine % 15 oranında benzerlik gösterirken , sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen (CTLA4) ile % 20 oranında benzerlik oranına sahiptir[61].



Şekil 2.9 :PD-1/PD-L1 Moleküler Yapısı[61].

PD-1, B7-CD28 ailesinden 288 amino asit içeren, hücre dışı bir N domain terminal alanına (IgV), membran geçirgen bir alana ve iki tirozin bazı içeren sitoplazmik bir kuyruğa sahip olan 55-kDa'luk transmembran proteinidir. Sırasıyla N- terminali ve C- terminali, tanımlanmış immünoresptör tirozin esaslı inhibitör motif (ITIM) ve immünoresptör tirozin bazıli anahtar motif (ITSM), sekanslarına sahiptir [6] (Şekil 2.10). PD-1 ekspresyonu, timusta TCD4 +, TCD8 +, B hücresi, NKT hücresi (Natural Killer hücrelerinde bulunan reseptörlerin çoğunu eksprese eden hücreler), aktive monositler, dendritik hücre (DC), makrofajlar ve olgunlaşmamış Langerhans hücrelerinde eksprese olurlar [62].

PD-1'in bilinen iki ligandı, B7 familyasına ait PD-L1 (ayrıca CD279 ve B7-H1 olarak da adlandırılır) ve PD-L2'dir (CD273 ve B7-DC'dir). PD-L1 kodlayan gen, 9. kromozom(9p24) üzerinde yer almaktadır. PD-L1, hücre dışı bölgesinde Ig- ve IgC benzeri bölgelere sahip olan 290 amino asit içeren, 33 D kDa'luk bir glikoproteindir [63]. PD-L1 çoğunlukla CD4+T hücrelerinde, antijen sunan hücrelerin yüzeyinde (APC'ler), makrofajlarda, B hücre ve dentritik hücrelerin yüzeyinde yapısal olarak eksprese olurlar[64].

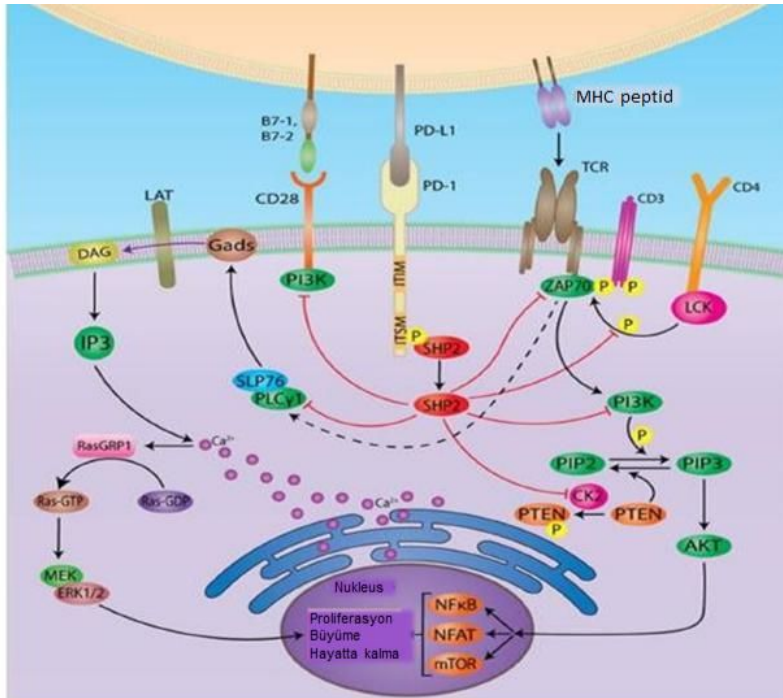
2.4. PD-1/PD-L1 Sinyal Yolağı

İlk olarak, bir in vivo ortamda immünsüpresif farelerde PD-1'in negatif düzenleyici işlevi gösterilmiştir [65]. Normal şartlar altında PD-1, inflamasyona tepki sırasında immün sistem hücrelerinde eksprese olan bir uyarıcı moleküldür. PD-L1, PD-1 reseptörü için tanımlanan ilk ligandır. PD-L1'in PD-1'e bağlanması, lenfositlerin T hücre reseptörünün aracılık ettiği proliferasyonu ve immün tepkime ile sitokinlerin salgılanmasını inhibe eder. T hücre reseptör sinyallerinin negatif regülasyonu sağlanmış olur. Bağışıklık düzenleme mekanizmasının önemli ve normal bir bileşeni olarak, PD-L1 ve PD-1 arasındaki etkileşim, otoimmünitenin önlenmesinde ve inflamasyona yanıtta önemli bir rol oynar. Bu süreç, immün sistem aktivasyonu durumunda konak doku hasarının inhibe edilmesinde önemlidir. PD-L1 keşfinden sonra, bu molekülün birçok tümörün yüzeyinde eksprese olduğu ortaya çıkmıştır. Bu yüzey proteinin ekspresyonun tümör hücreleri ve immün kaçış üzerindeki olası etkisi gösterilmiştir. PD-1, doğal doku hasarını önleyen ve bağışıklık sistemi aktivasyonu nedeniyle inflamasyona bir cevap olarak otoimmüniteyi koruyan önemli bir molekül olarak kabul edilir [66][67]. Bir süre sonra araştırmacılar PD-L1'in pekçok tümör yüzeyinde eksprese edildiği ve tümörün bağışıklık sistem gözetiminden kaçmasına neden olduğunu gösterilmiştir [68]. PD-L1 dışındaki kontrol noktaları da immün düzenlemede bir rol oynar. PD-L2, T hücrelerinin aktivasyonunu ve çoğalmasını sağlayan ikinci bir ligandır ve ayrıca

sitokinlerin üretimini inhibe edebilirler [69]. PD-L1, pekçok normal dokuda ve malign hücrelerde eksprese edilirken, PD-L2, esas olarak antijen sunan hücrelerden eksprese edilmektedir [70][71].

PD-1 bazı yollar aracılığıyla TCR sinyal iletimini etkiler. TCR sinyallemesinin ana mekanizmalarından biri fosfoinositid-3-kinaz /Akt (PI3K/AKT) yoludur. PI3k inhibisyonu ile PD -1, T hücre reseptör yolağı sinyal iletiminin önlenmesine yol açar. Ek olarak, ZAP70, CD3 ve PKC θ gibi önemli moleküller LCK (lökosite özgü tirozin kinaz) tarafından fosforile edilir ve T hücrelerini aktive etmeye devam eder. PD-1 yolu, LCK fonksiyonunu ve T hücre uyarılmasında önemli bir protein tirozin kinaz olan ZAP70'in fosforilasyonunu inhibe eder, bu da TCR sinyalinin inhibisyonuna neden olur [72].

Sitoplazmik PD-1'de, tirozin amino asit sekansı içeren iki bölge vardır. Sinyalizasyonun iletiminde rol oynayan bu bölgedeki tirozin bazılarının rolü, CD28 eş uyarımı ile birlikte değerlendirilmiştir. IL 2 üretiminin inhibisyonu gibi PD - 1 tarafından indüklenen inhibitör etkiler, ITIM tirozin fenilalanin (Y223-f) ile değiştirilerek korunur. Bununla birlikte, ITSM bölgesinin tirozin fenilalanin (Y248F) ile değiştirilmesi durumunda, bu engelleyici etkiler kaybolur.



Şekil 2.10:PD-1/PD-L1 Sinyal Yolları[6].

TCR sinyalini bloke etmek için PTK aktivasyonunu deaktive edecek protein tirozin fosfatazların engellenmesi ile T hücre aktivasyonuna yol açan fosforilasyonun tersine çevrilmesi gerekir. Bunlar arasında SH2 domain içeren fosfataz 1 (SHP-1) ve protein tirozin fosfataz nonreseptör tip 1 (PTPN1) vardır [73]. ITSM bölgesindeki tirozin yapısı, SHP1 ve SHP2 ile etkileşim halindedir(Şekil 2.11). Aynı zamanda; SHP2, Ca iyon aracılı B hücre reseptör mobilizasyonunu inhibe eder ve IgB, SyK, PLC -2, ERK1 ve ERK2 fosforilasyonunu engellemektedir. PD-1 yolu, LCK fonksiyonunu ve ZAP70'in fosforilasyonunu inhibe eder, bu da TCR sinyalinin inhibisyonuna neden olur. Sonuç olarak, T hücre sinyalizasyonunda pek mekanizmanın etkileşimi ile PI3K / Akt / mTOR yolunun aktivasyonu ve Ras / MEK / ERK yolunun aktivasyonu proliferasyonu artırıcı etki yaratmaktadır[6].

2.5. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Anti PD-1/PD-L1 Tedavisi

Tümör gelişimi bilinen bazı klinik çalışmalarda, akciğer kanseri de dahil olmak üzere erken faz denemelerinde, PD-1 kontrol noktası inhibitörleri (anti-PD-1 ve anti-PDL-1 antikoları) ileri veya metastatik KHDAK hastalarında denenmiştir; gelişmeler KHDAK dahil pek çok tümörün tedaviparadigmasını değiştirmiştir. Günümüzde bilinenimmünoterapi ajanlarıPD-1 antikolarından (nivolumab ve pembrolizumab) ile PD-L1 antikoları (atezolizumab, durvalumab, avelumab) klinikte kullanımı olan monoklonal antikolardandır. İmmün kontrol noktası inhibisyonu olarak PD-1/PDL-1, alternatif tedavi yöntemleri ile (diğer immün regülatuvartedaviler, kemoterapi veya hedefe yönelik tedaviler gibi) kombine olarak test edilerek, klinik açıdan geliştirilme aşaması günümüzde hala devam etmektedir [74][75].

Bu ilaçlar, sitotoksik kemoterapide olduğu gibi doğrudan tümör hücrelerini hedef almak yerine; immün toleransta rol oynayan ana mekanizmaları ve immün yanıtta tümörün kaçışını baskılayarak işlev görürler. Anti-PD-1 ve anti-PD-L1 monoklonal antikoları, daha önce hiç tedavi almamış ve tedavi görmüş hasta gruplarında, skuamöz ve skuamöz olmayan histoloji dahil, sitotoksik kemoterapi ile karşılaştırıldığında, önemli düzeyde aktivite, sağkalımda önemli sonuçlar ve güvenlik düzeyi iyi profil göstermiştir. Ayrıca, tümörlerinde PD-L1 eksprese etmeyen (PD-L1 negatif) olan hastalar, anti-PD-1 ilaçlarla tedavi edildiğinde, kemoterapi ile tedavi edilen hastalara benzer yanıtlar verdikleri gözlenmiştir. Fakat yüksek PD-L1 ekspresyonu seviyesine sahip olan hastalar, immün blokaj tedavi sistemine standart tedavilerden daha çok yanıt vermişlerdir [76].

Günümüzde KHDAK'de, FDA tarafından onay verilen anti-PD-1 immünoterapi ilaçları Nivolumab ve Pembrolizumab; anti PD-L1 için atezolizumab olmuştur. Araştırmada olan ve FDA incelemesi için bekleyen diğer anti-PD-1 ve anti-PD-L1 ilaçlar klinik açıdan değerlendirme sürecindedir. Kullanımı onaylanan Nivolumab, PD-1 durumundan bağımsız olarak onaylanırken; pembrolizumab sadece PD-L1 pozitif hastalar için onay almıştır. Her üç ajan da ikinci basamakta genel sağkalımda avantaj göstermiştir [77][78][79].

Kısa sürede, sadece KHDAK'de değil, aynı zamanda birçok malignitede de immünoterapi, kanser tedavisinde temel bir taş haline gelerek, gelecekte de kanser tedavisi için güçlü tedavi yöntemlerinden biri olabileceği düşünülmektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

PD-1 ve PD-L1 gen polimorfizmlerinin belirlenmesi için çalışma grupları; İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından KHDAK hastalığı tanısı konmuş kadın ve erkek hasta grubu ve herhangi bir patolojik bulgusu olmayan ve tercihen ailesinde tümör hikayesi olmayan sağlıklı kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Klinik parametrelere göre değerlendirme söz konusu anabilim dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 12/01/2018 tarih ve 01 sayılı toplantısında çalışma etik kurul onayı alınmış ve çalışmaya katılacak olan gönüllülere ameliyat öncesi, yapılacak araştırma ile ilgili bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutularak imzalatılmıştır. Çalışma gruplarına ait kan örnekleri İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda çalışılmak üzere EDTA'lı tüplere alınarak çalışmaya kadar soğukta muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu alınan kanlardan tuzda çöktürme ve kit protokolüne uygun biçimde yapılmıştır. Herbir izolasyona ait DNA konsantrasyonu Nanodrop spektrofotometresi kullanılarak ölçülmüştür. İzolasyonu tamamlanan DNA'lar -20 derecede saklanmıştır.

PD-1 düzeyleri, periferik kanlardan elde edilen ve çalışma anına kadar -80 derecede bekletilen serum örneklerinden, enzim bağlı immünabzorbant tahlili ELİZA (enzyme linked immunoabsorbent assay) yöntemi ile belirlenmiştir.

Protein düzeyinde yapılacak SDS Page ve Western blot analizi için, KHDAK kanseri tanısı konmuş hastalardan elde edilen 16 tümör dokusu ve 16 sağlıklı çevre dokusu örneklerinden izole edilen protein, PD-L1 antikoru ile muamele edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agaroza (Promega MBG)
- Amonyum asetat (Sigma A-8920)
- Asetik asit (Merck K-04134156)
- Beta-merkapt-etanola (Sigma, M7522)
- Etidyum bromür (Sigma E-8751)
- Etil alkol (%99) (Merck)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (Sigma, 9884)
- Hidroklorik asit (Sigma, H1758)
- Hidrojen peroksit (Sigma, 349887)
- İzopropanol (Sigma, 19516)
- Ksilen siyanol (Sigma, X4126)
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi)
- Proteinaz K (Sigma, P2308)
- pUC8 DNA size marker (MBI Fermentas)
- Sodyum borohidrid (MERCK)
- Sodyum Dedodesil Sülfat (SDS) (Sigma, L4390)
- Sodyum hidroksit (Merck C754962)
- Sodyum Klorid (NaCl) (Sigma, S3014)
- Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas)
- Tripan mavisi (Gibco, 15250061)
- Tris Baz (BioChemika, 93362)

3.1.3. Kullanılan Kitler

- PureLink Genomic DNA Mini Kit (LifeTech)
- PD-1 ELISA kit(Abcam)

3.1.4. Kullanılan cihazlar

- Buzdolabı (+ 4 °C Beko, Arçelik)
- Derin Dondurucu (-20 °C Beko)
- Çeker Ocak (Opas)
- Distile su cihazı (Millipore)
- Güç kaynağı (Stratagene)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Isı bloğu (Fisher scientific model111004)
- Masaüstü mini santrifüj (Eppendorf) (Hettich)
- Otomatik pipetler (Gilson) (Eppendorf)(Thermo)
- PZR cihazı (Thermal Cyclers) (BioRad)
- PH metre (Corning)
- Spektrofotometre (NanoDrop)
- Su banyoları (Fisher scientific)
- Laminar kabin (Hepa filtreli) (Thermo, Scientific)
- İnkübatörler (37°C - 56°C Elektro Mag)
- Masaüstü mini Santrifüj (Hettich)
- Orbital çalkalayıcı (Thermo, Scientific)
- Elektroforez Sistemi (E-C 350 MIDICELL)
- Güç kaynağı (E-C Apparatus Corporation)

- Mikrodalga fırın (Philco)
- UV transilluminator (Stratagene UV/White light)

3.1.5. Kullanılan tampon solüsyonları ve çözeltiler

• **Eritrosit Parçalama Çözeltisi (Red Blood Lysis buffer, RBL):**

8,74 gram Amonyum klorür

1 gram Potasyum bikarbonat

200 µl 0,5 M Etilen diamintetraasetat (EDTA)

Tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 ml distile su eklendi ve çözeltinin pH'sı 1N NaOH ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak 1 litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktararak 120 °C'de 15 dakika otoklavlandı ve +4°C'de saklandı.

• **Lökosit Parçalama Çözeltisi (White Blood Lysis buffer, WBL):**

25 ml 4 M NaCl

50 mL 0,5 M Etilendiaminasetat (EDTA)

Balon jojeye konularak 1 litreye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

• **Amonyum Asetat (9M NH₄Ac) :**

732.26 g NH₄Ac

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanıp, sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

• **Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %10 (pH 7.2)**

10 gram Sodyum dodesil sülfat tartıldı. Beher içine alınarak üzerine 80 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü ve pH'sı 7,2'ye ayarlandı. Sterilizasyon için 0.2 mikronluk filtreden geçirildi ve oda ısısında saklandı.

• **Proteinaz K (20mg/ml):**

20 mg Proteinaz K tartılarak steril bir tüp içinde steril distile su ile 1 ml'ye tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

• **Etilen Diamin Tetra Asetikasit (EDTA 0,5 M)**

186,1 gram Etilendiamintetraasetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml distile su eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürüldü ve pH'sı NaOH çözeltisi ile 8,0'e ayarlanarak distile su ile 1 litreye tamamlandı. 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

- **Tris EDTA (TE) pH: 8.0:**

10 ml 1 M Tris-HCL (pH 8.0)

20 ml 0.5 M EDTA

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve otoklavlanarak oda ısısında saklandı.

- **Etidyum Bromür (10 mg/ml)**

1 gram Etidyum bromür tartılarak steril distile su ile 10 ml'ye tamamlandı

- **5 X TBE (Tris baz-Borik asit-EDTA)**

54 gram Tris baz ve 27,5 gram borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ve 800 ml distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti balon jöjeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Oda ısısında saklandı.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Dna İzolasyonu

3.2.1.1. Tuzla Çöktürme Yöntemi İle DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örnekleri çalışılmak üzere uygun falkonlara alınarak 3 de 1 oranında eritrosit parçalama çözeltisi ile karıştırıldı ve 4 derecede 25 dakika bekletildi. Daha sonra örnekler 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve supernatant kısımları uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet üzerine 20 ml eritrosit parçalama çözeltisi ilave edildi. Tekrar örnekler 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Tekrar süpernatant uzaklaştırılarak en son elde edilen pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS, 50 µl proteinaz K (20mg/ml) ve 10 ml lökosit parçalama çözeltisi (WBL) eklenerek 56 °C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. Daha sonra üzerlerine 3,7 ml 9,5 M Amonyum asetat çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve yarım saat kadar 4500 rpm de santrifüj edildi. Çökelti kısmı atılıp, DNA içeren üst faz tüplere alındı. Tüplerin üzerine %99'luk etil alkol eklendi ve gözle görünür olan DNA pipet ucuyla yakalanarak ependorflara alındı. Üzerine uygun miktarda dH₂O eklenerek DNA çözdürüldü ve kalitesini ölçmek için NanoDrop spektrofotometre kullanıldı. Elde edilen örnekler -20 derecede daha sonra çalışılmak üzere saklandı.

3.2.1.2. Kit İle DNA İzolasyonu

Su banyosu veya ısı bloğu 55 °C'ye ayarlandı. Ependorf tüpüne 200 µl kan örneği koyuldu. Örneğe 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNase A eklendi. Kısa süreli olarak vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Üzerine 200 µl liziz/bağlayıcı tampon eklendi ve homojen bir solüsyon elde edene kadar vortekslenerek iyice karıştırıldı. Karışım 55 °C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışıma 200 µl %96-100 etanol eklendi ve kısa süre vortekslenerek karıştırıldı. % 96-100 etanol yıkama tamponu 1 ve yıkama tamponu 2'ye eklendi, iyice karıştırıldı ve oda ısısında saklandı. Liziz/bağlayıcı tampon ve etanol ile hazırlanan karışım spin kolonuna eklendi. Kolon oda ısısında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl etanollü yıkama tamponu 1 eklendi. Kolon oda ısısında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon oda ısısında 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi. Kolona 500 µl etanollü yıkama tamponu 2 eklendi. Kolon oda ısısında maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. Spin kolon steril bir 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirildi. Kolona 200 µl elüsyon tamponu eklendi. Oda ısısında 1 dakika inkübe edildi. Kolon oda ısısında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi. Başka bir steril 1,5 ml'lik ependorfa tekrar 200 µl elüsyon tamponu eklendi ve kolon oda ısısında maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edildi. Ependorf içinde DNA bulunmaktadır. Kolon çıkarılır ve atılır. DNA'lar - 20 °C'de saklandı.

3.2.2. Dna Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA konsantrasyonunun ve saflığının tespit edilmesi için spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ısı ışığı soğurma (OD) ölçümü yapıldı. 260nm'deki OD/280 nm'deki OD oranı hesaplanarak DNA'nın saflık derecesi bulundu.

3.2.3. PD-1 C/T Gen Polimorfizmlerinin Tespit Edilmesi

3.2.3.1. PD-1 C/T Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer Dizileri

PD-1 C/T ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu primerler uluslararası yayınlarda doğrulanmış primer dizileridir [80].

İleri primer: 5' - GGACAGCTCAGGTAAGCAG -3'
 Geri primer: 5' - AAGAGCAGTGTCCATCCTCAG -3'

3.2.4. PD-L1 A/C Gen Polimorfizmlerinin Tespit Edilmesi

3.2.4.1. PD-L1 A/C Gen Polimorfizminin Tespitinde Kullanılan Primer

PD-L1 A/C ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerlerin nükleotid dizisi aşağıda verildiği şekildedir. Bu çalışmaya özgü sentez edilmiş primer dizileridir.

İleri primer: 5'-AATGGCTTGTGTCCAGAGATG-3'
 Geri primer: 5'-GTACCACATGGAGTGGCTGC-3'

3.2.5. PZR'de Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışı

DNA Taq polimeraz enzimi (5 U/μl) (Intron Biotechnology, i-StarTaq™ DNA Polymerase): PZR reaksiyonundaki son konsantrasyonu 1 ünite olacak şekilde 25 μl'lik PZR reaksiyonuna eklendi.

3.2.5.1. PZR Karışımının Hazırlanışı

Toplam reaksiyon hacmi 25 μl olacak şekilde PD-1 gen bölgesi için Tablo 3.1'de belirtilen bileşenler sırası ile 0,5 ml'lik steril tüpe koyuldu. PZR karışımının hazırlanma işlemlerinin hepsi buz üzerinde soğukta ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Tablo 3. 9: PZR Karışımının İçeriği

PZR Karışımı	dH ₂ O	Mg Free	MgCl ₂ (25 mM)	dNTP (2,5 mM)	İleri primer (10 pmol/μl)	Geri primer (10 pmol/μl)	Taq polimeraz (5 U/μl)
Miktar	17,2 μl	2,5 μl	1,5 μl	1,5μl	0,5 μl	0,5 μl	0,3 μl

Hazırlanan PZR karışımından örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik tüplere 24 μl reaksiyon karışımı dağıtıldı. Daha sonra her tüpe 1 μl DNA eklendi ve daha önceden 95 °C sıcaklığa çıkarılmış PZR cihazına (Biorad Thermal Cycler) örnekler yerleştirildi ve PZR işlemi başlatıldı.

3.2.5.2. PZR Koşulları

PD-1 C/T gen polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 57 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.2). PD-L1 A/C gen

polimorfizmini tespit etmek için kullanılan ileri ve geri primerler için annealing derecesi optimize edilerek 63,5 °C sıcaklık kullanıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3. 10: PD-1 C/T Gen Polimorfizmi PZR Reaksiyon Koşulları

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	45 sn	} 35 Döngü
Primer Bağlanması	57 °C	45 sn	
Zincir Uzaması	72 °C	45 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	

Tablo 3. 11: PD-L1 A/C Gen Polimorfizmi PZR Reaksiyon Koşulları

Ön Denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	45 sn	} 35 Döngü
Primer Bağlanması	63,5 °C	45 sn	
Zincir Uzaması	72 °C	45 sn	
Son Uzama	72 °C	5 dk	

3.2.6. %2'lik Agaroze Jel Hazırlanması

4 gr agaroz (Promega MBG) tartılarak erlen içine koyuldu. Üzerine son hacim 200 ml olacak şekilde 1xTBE tamponu eklenerek, mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözdürüldü. Erlenin sıcaklığı elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde (50-55 °C) çözülmüş

agaroz jel içine 4,5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) ilave edildi. Hazırlanan jel yatay jel yatağı içine dökülerek, yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel örnek yüklenmesi için hazır duruma geldi.

3.2.6.1. PZR Ürünlerinin %2'lik Jele Yüklenmesi

%2'lik jel hazırlandıktan sonra 1xTBE tamponu içeren jel tankı içine uygun şekilde koyuldu. Agaroz jelin üzerini 2-3 ml geçecek şekilde 1xTBE tamponu jel üzerine eklendi. 7 µl PZR ürününe, 3 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı (E-Capparatus Corporation, E-C4000P) 250 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.2.6.2. PZR Ürünlerinin Kontrolü

PD-L1 A/C PD-1 C/T'ye ait hedef gen bölgeleri ile ilgili PZR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla PZR tüplerinden alınan 7 µl örnek 3 µl 6xLoading Dye (Intron Biotechnology) ile karıştırılarak yukarıda tanımlanan elektroforez sisteminde yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel UV ışık altında (304 nm dalga boyunda) PZR ürünleri incelendi ve fotoğrafı UV transillüminator düzeneğinde çekildi. PZR reaksiyonları sonucu PD-1 C/T geninden 213 bp'lik, PD-L1 A/C geninden 553 bp'lik ürün elde edilmesi beklendi.

3.2.7. PD-1 C/TGeni Pzr Ürünlerinde PvuII Enzim Kesimi

3.2.7.1. PvuII Enzim Kesiminde Kullanılan Kimyasal Maddeler

PvuII Kesim enzimi (10 U/µl) (Thermo Fisher Scientific): PvuII enzimi 10X Buffer G tamponu ile birlikte kullanıldı. PvuII enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:

5'....CAG CTG...3'

3'....GTC GAC...5'

3.2.7.2. PvuII Enzim Kesimi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 µl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.4'de belirtilen çözeltilerin ve PvuII enziminin sırasıyla eklenmesi ile

gerçekleştirildi. 213 baz çiftlik PZR ürünü kesimi PvuII enzimiyle 37 °C’de 2 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3. 12:PvuII enzim kesimi içeriği

Kesim Karışımı	ddH ₂ O	10X Buffer G Tamponu	PvuII enzimi (10 U/μl)	PZR ürünü
Miktar	4,25 μl	0,5 μl	0,25 μl	5 μl

3.2.8. PD-L1 A/C Geni Pzr Ürünlerinde BanII Enzim Kesimi

3.2.8.1. BanII Enzim Kesiminde Kullanılan Kimyasal Maddeler

BanII Kesim enzimi (10 U/μl) New England Biolabs (NEB):BanII enzimi CutSmart Buffer tamponu ile birlikte kullanıldı. BanII enziminin tanıdığı dizi ve kesim yeri:



3.2.8.2. BanII Enzim Kesimi

PZR ürünü saptanmış örneklerden toplam hacmi 10 μl olacak şekilde restriksiyon enzim kesimi Tablo 3.5’de belirtilen çözeltilerin ve BanII enziminin sırasıyla eklenmesi ile gerçekleştirildi. 553 baz çiftlik PZR ürünü kesimi BanII enzimiyle 37 °C’de 16 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Tablo 3. 13: BanII enzim kesimi içeriği

Kesim Karışımı	ddH ₂ O	CutSmart Buffer Tamponu	BanII enzimi (10 U/μl)	PZR ürünü
Miktar	2,75 μl	2 μl	0,25 μl	5 μl

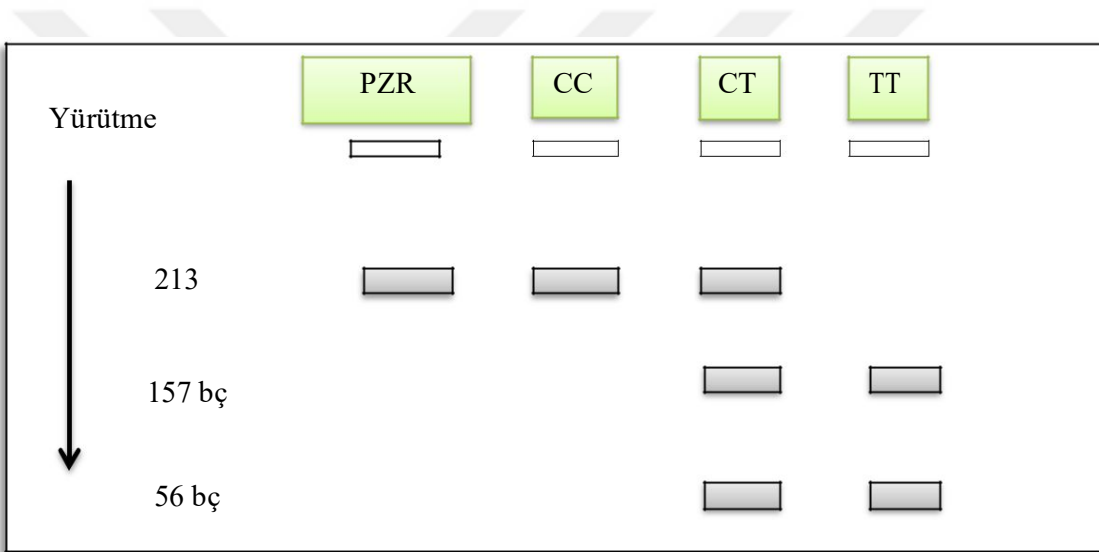
3.2.9. PD-L1 A/C ve PD-1 C/T Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi

%2’lik agaroz jel hazırlandı. İlgili kesim enzimleri ile kesilen PZR ürünlerinden 8 μl ve yükleme tamponundan 2 μl alınarak karıştırılıp %2’lik agaroz jeldeki kuyulara yükleme yapıldı. Kesim ürünleri (Fermentas PUC 19, 50 bp marker veya 100 bp marker) DNA

moleküler marker ile birlikte yürütüldü. Yürütme sonrası jel üzerindeki bantlar, UV ışık (304 nm) altında incelendi.

3.2.9.1. PD-1 C/T Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

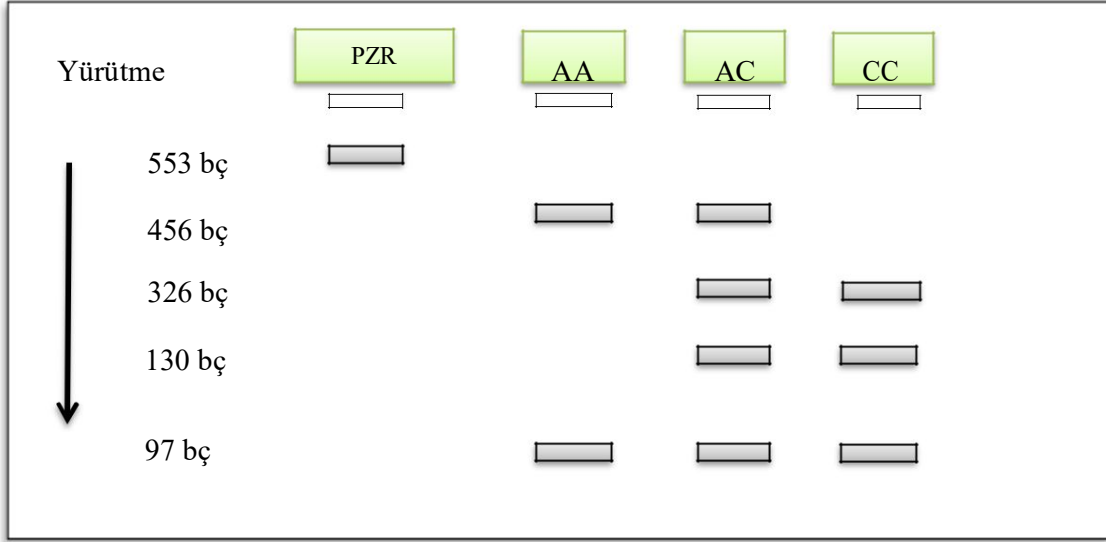
Uygun koşullar altında PvuII enzim ile kesilen PZR ürünlerinden CC genotipine sahip örnekler 213 bp büyüklüğünde tek bant verirken, homozigot TT mutasyonu içeren PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 157 bp, 56 bp olmak üzere iki bant vermektedir. Heterozigot CT genotipine sahip mutasyonlu PZR kesim ürünleri ise 213,157 ve 56 bp olmak üzere üç bant vermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3 3: PD-1.5 C/T Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.2.9.2. PD-L1 A/C Gen Polimorfiziminin Değerlendirilmesi

Uygun koşullar altında BanII enzim ile kesilen PZR ürünlerinden AA genotipine sahip örnekler 456 ve 97 bp büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot CC mutasyonu içeren PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 326,130 bp ve 97 bp olmak üzere üç bant vermektedir. Heterozigot AC genotipine sahip mutasyonlu PZR kesim ürünleri ise 456, 326, 130 ve 97 bp olmak üzere üç bant vermektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3 4: PD-L1 A/C Gen Polimorfizminin Şematik Jel Görüntüsü

3.2.10. Serum PD-1 Düzeyinin Elisa Yöntemi ile Tayini

Çalışmada ‘Abcam’ tarafından geliştirilen Human Soluble Programmed Cell Death 1 (sPD-1) ELISA test kiti kullanılmıştır. Örnekler kitte bulunan Sample Diluent ile sulandırıldı. Her bir sample kuyusuna 40 µl sample diluent, üzerine ise 10 µl serum örneği eklendi. 45 dakika 37 °C inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 250µl yıkama tamponu eklenerek 5 kez iyice yıkandı. Kurutulduktan sonra 50 µl HRP-Konjugat eklenerek plate kaplanıp oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Tekrar aynı şekilde 250µl yıkama tamponu eklenerek 5 kez iyice yıkandı edildi. İyice yıkandığından emin olunan kuyucuklara daha sonra 50’şer µl kromojen A ve B eklenir ve oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika inkübe edildi ve her kuyucuğa 100 µl durdurma solusyonu eklenip, bekletme yapmadan ELISA cihazında okutuldu. Sonuçlar ELISA okuyucusunda 450nm dalga boyunda okunduktan sonra pg/ml olarak hesaplanmıştır. Kitin sensitivity değeri 3.0 pg/ml’ den daha düşük olarak belirlenmiştir.

3.2.11. SDS Page ve Western Blot Analizi ile PD-L1 Protein Analizi

3.2.11.1. TRIzol ile Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Homojenizasyonu

Doku örneklerinden protein izolasyonu için TRIzol® Reaktif (TRIzol® Reagent, Ambion by Life Technologies, Cat. no.15596-026) kullanıldı. TRIzol® Reaktif daha uzun süreli kullanım için oda sıcaklığında (RT) saklandı. -80°C'den alınan 50-100 mg dondurulmuş olan doku örnekleri ile buz üzerinde ve çeker ocakta 1 ml TRIzol® Reaktif kullanılarak oda sıcaklığında homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenize edilmiş örnekler faz ayrımı işlemine kadar -80°C'de saklandı.

3.2.11.2. Faz Ayırma ve Protein İzolasyonu

Depolanmış örnekler, faz ayrımı için oda sıcaklığında 5 dakika boyunca erimeye bırakıldı. Bir tüpe 200 µl kloroform eklendi ve tüp dikkatlice kapatıldı. Ardından, tüpler 15 saniye boyunca el ile çalkalandı. Örnekler oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildikten sonra 4 ° C sıcaklıkta 12,000 xg'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Faz ayrılmasından sonra; kırmızı bir fenol-kloroform fazı, ara faz ve bir üst sulu faz elde edildi. Protein izolasyonu için kırmızı fenol-kloroform faz ve interfaz kullanıldı. Numunelerin üzerine 300 µl %100 etanol ilave edildi ve tüpler birkaç kez ters çevrilerek karıştırıldı. Numunelerin oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübasyonundan sonra, tüpler 2000 x g'de 5 dakika 4 ° C'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra, feniletanol süpernatanı, protein izolasyonu için yeni bir tüpe toplandı. Fenol-etanol süpernatanına 1.5 mL izopropanol ilave edildi ve örnekler, oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Proteinini çöktürmek için, örnekler 12,000 x g'de 10 dakika boyunca 4 ° C'de santrifüjlendi ve süpernatan uzaklaştırıldı.

3.2.11.3. Protein Yıkama ve Protein Süspansiyonu

Protein pelletini yıkamak için yıkama çözeltisi olarak % 95 etanolde içinde 0.3 M guanidin hidroklorür kullanıldı. Pellete 2 mL yıkama çözeltisi ilave edildi ve örnekler, oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra, 4 ° C'de 5 dakika boyunca 7500 x g'de santrifüjleme yapıldı ve süpernatan atıldı. Protein yıkama işlemi iki kez daha tekrar edildi. Üçüncü yıkama tamamlandıktan sonra, protein pelletine 2 mL % 100 etanol ilave edildi ve vorteks ile karıştırıldı. Numunelerin oda sıcaklığında 20 dakikalık inkübasyonunun ardından 4°C'de 5 dakika boyunca 7500 xg'de tüplerin santrifüjlendi ve süpernatan atıldı. Daha sonra, protein pelletinin 5-10 dakika boyunca oda sıcaklığında kurutulması sağlandı. 200 µl %1 SDS protein peletine eklenerek iyice pipetaj yapıldı.. Pellet içerisinde

çözünmeyen protein dışı tüm materyalleri çöktirmek için son kez 4°C'de 10 dakika boyunca 12,000 xg'de santrifüjlendi. Bundan sonra, protein içeren süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı ve daha sonra kullanılmak üzere 20 ° C'de saklandı.

3.2.11.4. . BCA Kiti ile Konsantrasyon Tayini

İzole edilmiş doku numunelerinin protein konsantrasyonunun belirlenmesi SMART BCA Protein Test Kiti (Cat. No.21071) ile yapıldı. Testten önce, tüm numuneler standartlarla birlikte seyreltildi ve daha sonra her standardın 25 ul'si ve numuneler, düz tabanlı 96 kuyucuklu plakanın oluklarına yerleştirildi. Plaka, 50:1 seyreltme oranında hazırlanan 200 ul çalışma çözeltisi ilave edildikten sonra yarım saat boyunca 37 derecede alüminyum folyo kapatılarak inkübe edildi. OD değerleri 562 nm'de ölçüldü. Tüm numunelerin konsantrasyonu, çizilen eğriye göre hesaplandı.

3.2.11.5. SDS-PAGE için Protein Örneklerinin Hazırlanması

İzole edilmiş protein örnekleri, dokulardaki PD-L1 ifadelerini saptamak sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot deneyleri için kullanılmıştır. SDS-PAGE jelinin her oyuğuna eşit konsantrasyonda protein yüklemek için eşitlenen protein örnekleri 200 ug olacak şekilde kuyucuklara yüklendi SDS -PAGE çalışması için örnekler hazırlanırken, Optiblot LDS Sample Buffer (4X, Abcam, ab119196) kullanıldı. Elde edilen proteinler, oyuklara yüklenmeden önce 95 ° C'de 10 dakika denatüre edildi.

Tablo 3. 14:Optiblot LDS Sample Buffer Hazırlanması

4X Sample Buffer	Miktar	Final
1M Tris/HCl (pH 6.8)	2,4 ml	240 mM
%100 (v/v) glycerol	4 ml	%40
SDS	0,8 g	%8
Bromophenol Blue	4 mg (500µl)	%0,04
β-mercaptoethanol	0,5 ml	%5
ddH ₂ O	3,1 ml (2,6 ml)	

3.2.11.6. SDS-PAGE Yürütme

Dikey elektroforez seti SDS-PAGE işlemi için kullanıldı. Kullanmaya başlamadan önce tank ve separatör distile su ile durulandı. Camlar ve taraklar %70 etanol ile temizlendi ve kurutuldu. Dikey elektroforez seti kuruldu ve örneklerin yükleneceği ve yürütüleceği %10'luk Separating jel ve %5'lik Stacking jel hazırlandı.

Tablo 3. 15:%10'luk Separating jel hazırlanması

%10 Separating Jel	10 ml	5 ml
Distile su	4 ml	2 ml
%30 Acrylamide	3,3 ml	1,65 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,5 ml	1,25 ml
%10 SDS	0,1 ml	50 µl
%10 APS	0,1 ml	50 µl
TEMED	4 µl	2 µl

Tablo 3. 16:%5 Stacking Jel hazırlanması

%5 Stacking Jel	5 ml	2 ml
Distile su	3,4 ml	1360 µl
%30 Acrylamide	0,83 ml	332 µl
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0,63 ml	252 µl
%10 SDS	0,05 ml	20 µl
%10 APS	0,05 ml	20 µl
TEMED	5 µl	2 µl

Mini-Protean® Tetra Sistemi (Bio-Rad) ve Mini Trans-Blot® Hücre Sistemi (Bio-Rad), sırasıyla SDS-PAGE'nin ve protein lekelerinin çalıştırılması için kullanıldı. Dikey elektroforez seti kuruldu, tüm camlar ve taraklar,% 70 etanol ile temizlendi ve jeller hazırlanmadan önce kurutuldu. Elektroforez setinde, çalışan her SDS-PAGE için 10 oyuklu taraklar kullanıldı.

Jeller tanka yerleştirildikten sonra, tank belirlenen seviyeye kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. 1X yürütme tamponu hazırlamak için 10X TGS Running Buffer (Bio-Rad, Kat. No. 161-0732) kullanıldı. 20 µl hazırlanmış protein numunesi ve 3,5 µl protein standardı (Bio-Rad, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, #1610374, 10–

250 kD) kuyucuklara yüklendi ve SDS-PAGE çalışması, 15 dakika boyunca 50 V'de gerçekleştirilirken daha sonra voltaj 150 V'a yükseltildi ve çalıştırma 1 saatte tamamlandı. Yürütme işleminden sonra dikey elektroferez aparatı tankın içinden çıkartıldı ve camlar dikkatli bir şekilde açılarak jeller çıkartıldı. Stacking jel kısmı kesilerek atıldı. Separating jel distile su içerisinde 1-2 dakika boyunca yıkandı.

3.2.11.7. Western BlotWet Transfer

1X transfer tamponu hazırlamak için 10X TG Transfer Tamponu (Bio-Rad, Cat. No. 161-0734) kullanıldı. Aşağıdaki Tablo 3.9'a göre hazırlanan 1X transfer tamponu 4 ° C'de saklandı.

Tablo 3. 17:1X Transfer Tamponu Hazırlanması

Transfer Buffer	1X
Tris	3,03 g
Glycine	14,4 g
Methanol %100	200 ml
ddH ₂ O	800 ml

Süngerler, filtre kağıtları transfer buffer içerisinde 5-10 dakika ekilibre edildi. SDS-PAGE sonucunda camların arasından çıkarılmış ve distile su içerisinde yıkanmış jel transfer buffer içerisinde 3-5 dakika bekletilerek, PVDF membran %100'lük metanol içerisinde 2 dakika inkübasyon ile aktiveleştirilmesi sağlandı. Membranın her yerinin metanol ile ıslandığından emin olunarak aktiveleştirilmiş mambran transfer buffer içerisine alındı ve 2 dakika boyunca yavaş bir şekilde çalkalanarak ekilibre edildi. Membranın üzerine, transfer buffer içinde ekilibre olmuş jel yerleştirildi. Oluşturulmuş filtre kağıdı-membran-jel-filtre kağıdı sandviçinin arasında hiçbir hava kabarcığının kalmadığından emin olmak için bir roller ile sağdan-sola, yukarıdan-aşağı ve tam tersi yönlerde olmak üzere hafif bastırılarak geçildi. Kaset ve bir buz bloğu tanka yerleştirildi ve tank önceden soğutulmuş 1X transfer tamponu ile dolduruldu. Transfer, 100V'de soğuk bir odada (4 ° C), 1 saat boyunca 350 mA'da yapıldı. Transfer tamamlandığında, kaset tanktan çıkarıldı ve transfer verimliliğini kontrol etmek Bio-Safe TM Coomassie blue stain (Bio-Rad, Kat. No. 1610786, g-250) ile muamele edildi.

3.2.11.8. Bloklama ve Antikor İnkübasyonu

Transfer sonrasında membran kurumamasına dikkat edilerek hızlıca kasetin içinden çıkarılarak 1X TBS-T ile 3-5 dakika boyunca yıkandı. Ardından membran 1X TBS-T içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu ile 1 saat, oda sıcaklığında ve çalkalayıcıda blokladı. Membranın bloklanmasından sonra primary antikor inkübasyonu 4°C'de overnight ve çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi. Primary antikor %5'lik bloklama solüsyonu (%5'lik süt tozu) içerisinde ve belirtilen konsantrasyonda hazırlanarak anti PD-L1 antikor Rabbit polyclonal Anti-beta-actin Antibody (Abcam, ab119716, 1:5000) protokolüne göre hazırlandı.

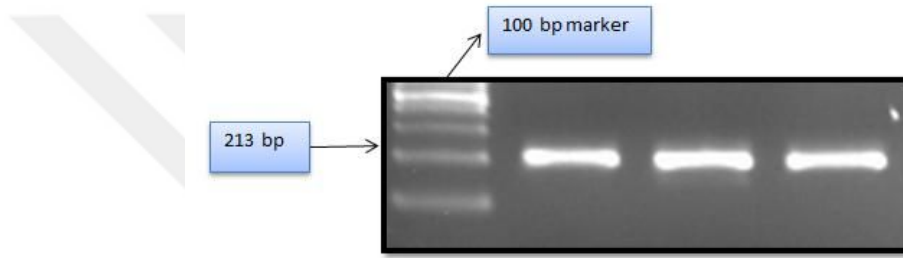
Overnight birincil antikor inkübasyonundan sonra membran 4 defa, 5'er dakika olacak şekilde oda sıcaklığında, 1X TBS-T ile çalkalayıcıda yıkandı. İkincil antikor (Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - Fc (HRP) Abcam, ab97069) benzer şekilde %5'lik 1X TBS-T içerisinde ve belirtilen oranlarda hazırlanarak; 1 saat, oda sıcaklığında ve çalkalayıcı üzerinde ikincil antikor inkübasyonu gerçekleştirildi. İkincil antikor inkübasyonundan sonra membran 4 defa 5'er dakika ve 1 defa 15 dakika olmak üzere toplamda 5 kez oda sıcaklığında, 1X TBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı ve yıkamanın ardından görüntüleme yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. PZR Ürünlerinin Kontrolüne Ait Bulgular

4.1.1. PD-1 C/T PZR Ürünü ile İlgili Bulgular

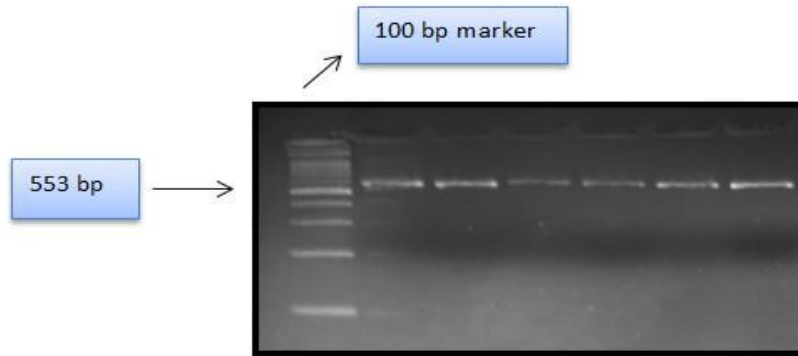
PD-1 C/Tgen bölgesinin PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde 213 bç'lik özgül PZR ürününe ait bant elde edildiği gözlemlendikten sonra **Pvu II** enzim kesimi ile gerçekleştirildi (Şekil 4-1).



Şekil 4. 1: PD 1 C/T PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.
(Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU)

4.1.2. PD-L1 A/CPZR Ürünü ile İlgili Bulgular

PD-L1 A/C gen bölgesinin PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Agaroz jelde 553 bç'lik özgül PZR ürününe ait bant elde edildiği gözlemlendikten sonra **Ban II** enzim kesimi ile gerçekleştirildi (Şekil 4-2).

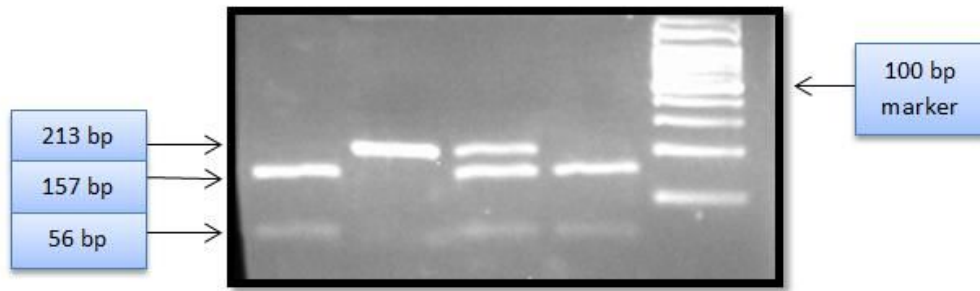


Şekil 4. 2: PD-L1 A/CPZR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.
(Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU)

4.2. Kesim Ürünlerinin Kontrolüne Ait Bulgular

4.2.1. Pvu II Enzim Kesimi ile rs2227981 C/T Mutasyon Taraması Bulguları

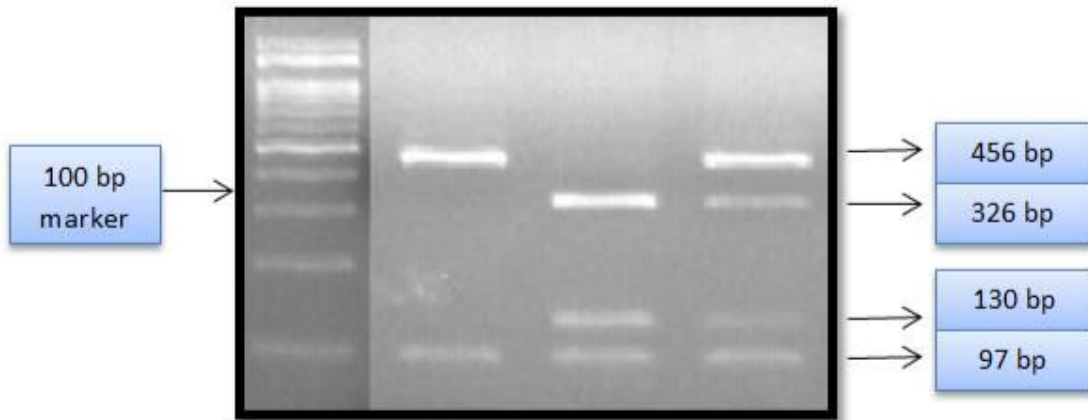
PD-1 C/T PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, PZR ürünlerine PvuII enzim kesimi uygulandı. PvuII enzim kesimi sonrası kesim ürünleri %2'lük agaroz jel elektroforezde yürütüldü. PvuII enzim kesimi sonrası agaroz jelde yürütülen PZR ürünlerinden CC genotipine sahip örnekler 213 bç büyüklüğünde, TT mutasyonu içeren PZR ürünleri 157 bç, 56 bç büyüklüğünde, CT genotipine sahip PZR kesim ürünleri ise 213,157 ve 56 bç olmak üzere üç band vermiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3: Pvu II enzim kesim ürünlerinin %2'lük agaroz jeldeki görüntüsü.
Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU

4.3. Ban II Enzim Kesimi ile rs2890658 A/C Mutasyon Taraması Bulguları

PD-L1 A/C PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenip kontrol edildikten sonra, PZR ürünlerine Ban II enzim kesimi uygulandı.



Şekil 4. 4: Ban II enzim kesim ürünlerinin %2'lük agaroz jeldeki görüntüsü.
Marker: GeneDirex 100 bp DNA Ladder RTU

Ban II enzim kesimi sonrası, kesim ürünleri %2'lük agaroz jel elektroforezde yürütüldü. PZR ürünlerinden AA genotipine sahip örnekler 456 ve 97 bç büyüklüğünde iki bant verirken, homozigot CC mutasyonu içeren PZR ürünleri, enzim kesimi sonrası 326,130 bç ve 97 bç olmak üzere üç bant vermektedir. Heterozigot yani AC genotipine sahip mutasyonlu PZR kesim ürünleri ise 456, 326, 130 ve 97 bç olmak üzere üç bant vermektedir (Şekil 4.4).

4.4. İstatistiksel Analiz Sonucunda Elde Edilen Bulgular

Çalışmaya “İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı”nda KHDAK tanısı konulan 80 akciğer kanseri hastaları ile bu klinikte tetkik edilen, kronik hastalık ya da malignite hikayesi bulunmayan 79 sağlıklı kontrol birey dahil edilmiştir. Tüm bu olguların verileri kendi içinde sınıflandırılarak genotipleme ve protein analizleri yapılarak, istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen KHDAK hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait özellikler Tablo 4.1’de özetlenmiştir. Yaş parametresine göre yapılan değerlendirme sonucunda kontrol grubunun yaş ortalaması $56,06 \pm 11,0$ hasta grubunun yaş ortalaması $60,2 \pm 10,2$ şeklinde bulunmuştur. Buna göre hasta ile kontrol grubu arasında yaş parametresi açısından istatistiksel anlamlılık mevcut değildir.

Olgular arası cinsiyet dağılımı değerlendirildiğinde KHDAK olgularının 71’i erkek 9’u kadın, sağlıklı kontrollerin 61’i erkek 18’i kadından oluşmaktadır. Cinsiyet farklılığı KHDAK hasta ve sağlıklı kontrollerde istatistiksel olarak bir anlamlılık oluşturmamıştır.

Sigara içme durumu ile KHDAK’lı bireylerin varlığı sağlıklı bireylerin sigara içme durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$) (Tablo 4.1)

Tablo 4.1 : Çalışma Gruplarına Ait Veriler

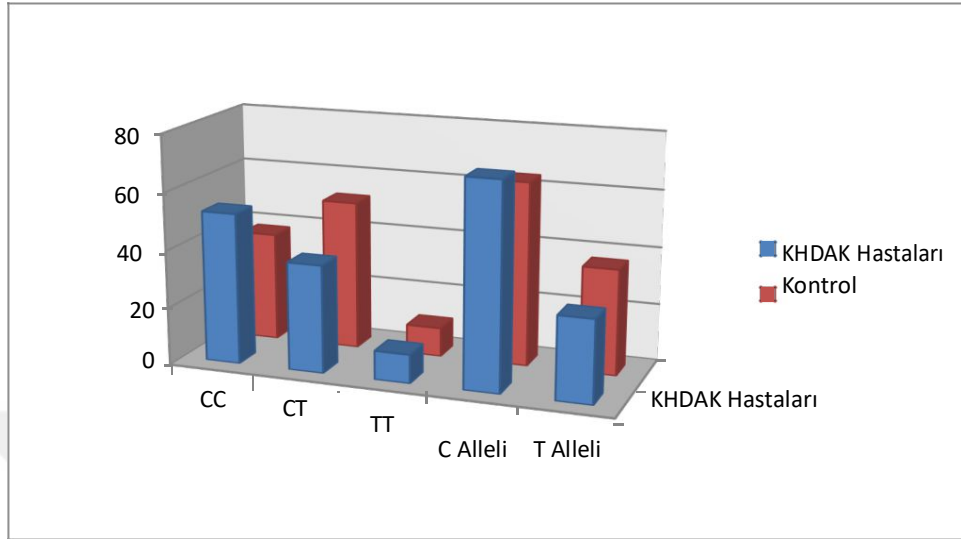
Parametreler			Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastaları (n:80)	Sağlıklı kontroller (n:79)	P değeri
Yaş (year) mean ± (SD)			60,2 ± 10,2	56,06 ± 11,0	0,051
Cinsiyet	Erkek	n	71	61	0,053
		%	88,8	77,2	
	Kadın	n	9	18	
		%	11,2	22,8	
Sigara İçme durumu	Var	n	75	-	p<0,01
		%	93,8	-	
	Yok	n	5	79	
		%	6,2	100	
Sigara kullanımı Paket/yıl mean ± (SD)			47,5 ± 27,39	-	p<0,001
Sigara kullanımı Paket/yıl					
n (%) < 20 paket/yıl			10 (12,5)	-	p<0,001
n (%) ≥ 20 paket/yıl			70 (87,5)	-	
n (%) < 30 paket/yıl			25 (31,2)	-	p<0,001
n (%) ≥ 30 paket/yıl			55 (68,8)	-	

n:birey sayısı; SD: standart deviasyon

Tablo 4.2:Küçük hücreli dışı akciğer kanser ve sağlıklı kontrollerde PD-1 C/T genotipleri

GENOTİPLER (PD-1 C/T)	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hastaları	Sağlıklı kontroller	P değeri
	n (%)	n (%)	
CC	42 (52,5)	30 (38)	=0,157
CT	30 (37,5)	41 (51,9)	
TT	8 (10)	8 (10,1)	
C Alleli	114 (71,25)	101 (63,92)	= 0,163
T Alleli	46 (28,75)	57 (36,8)	

n: birey sayısı; gruplararası farklılık Kikare (χ^2) ile incelenmiştir.



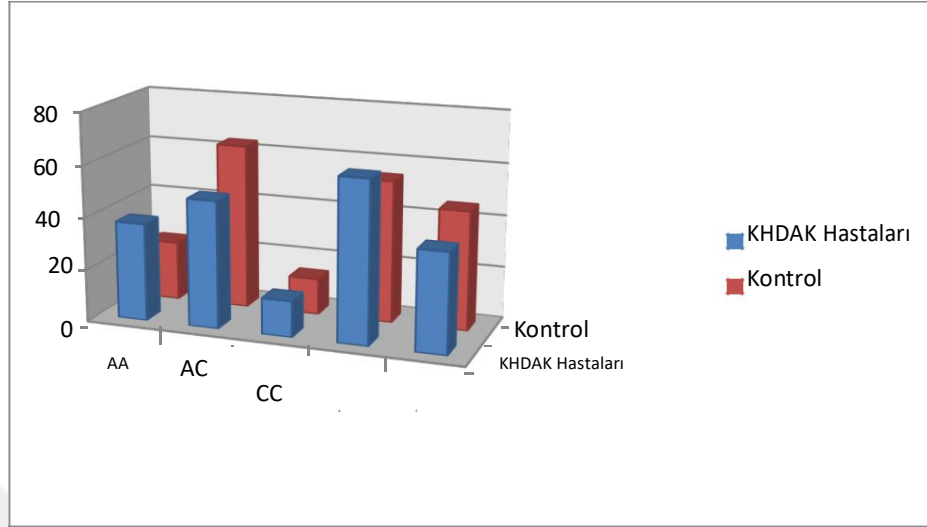
Şekil 4. 5:KHDAC hastaların ve kontrollerde PD-1 C/T genotipleri

PD-1 C/T gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde genotip dağılımı açısından çalışma grubumuz incelendiğinde kontrol grubu ve küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.157$) (Tablo 4.2). Benzer şekilde PD-1 C/T polimorfizmi için kontrol grubu ve küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları arasında allel dağılımı açısından da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p=0,163$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.3:Küçük hücreli dışı akciğer kanser ve sağlıklı kontrollerde PD-L1 A/C genotipleri

GENOTİPLER (PD-L1 A/C)	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser Hastaları	Sağlıklı kontroller	<i>P değeri</i>
	n (%)	n (%)	
AA	30 (37,5)	18 (22,8)	0,113
AC	39 (48,8)	50 (63,3)	
CC	11 (13,8)	11 (13,9)	
A Alleli	99 (61,88)	86 (54,43)	0,178
C Alleli	61 (38,12)	72 (45,57)	

n: birey sayısı; gruplararası farklılık Kikare (χ^2) ile incelenmiştir.



Şekil 4. 6:KHDAK hastaları ve kontrollerde PD-L1 A/C genotipleri

PD-L1 A/C gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde genotip dağılımı açısından çalışma grubumuz incelendiğinde PD-L1 A/C genotiplerinin dağılımında kontrol grubu ve küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.113$) (Tablo 4.3).

PD-L1 A/C gen polimorfizmine ait allel frekansları değerlendirildiğinde A allel frekansının KHDAK hastalarında (%61,8) kontrol grubuna göre (%54,43) yüksek olduğu, C allel frekansının ise hasta grubunda (%38,12) kontrol grubuna (%45,57) göre düşük olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır. ($p=0,178$) (Tablo 4.3).

Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında PD-L1 A/C polimorfizmi için AA genotipi taşıma durumu hastalarda (%37,5) daha yüksek olup, kontrollerde (% 22,8) olarak bulunmuştur. Aradaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0.043$, OR:1,646 %95CI:1,003-2,699) (Tablo 4.3).

Tablo 4.4:PD-1 C/T genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması

	PD 1.5 C/T			<i>P değeri</i>
	CC	CT	TT	
Tümör evresi				
T3+ T4	12 (50)	11 (45,8)	1 (4,2)	0,398
T1+ T2	30 (53,6)	19 (33,9)	7 (12,5)	
Lenf Nod Metastazı				
N1, N2, N3	16 (51,6)	13 (41,9)	2 (6,5)	0,634
N0	26 (53,1)	17 (34,7)	6 (12,2)	
Uzak Metastaz				
Yok	42 (53,8)	28 (35,9)	8 (10,3)	-
Var	-	2 (100)	-	
Perinöral invazyon varlığı				
Yok	26 (44,8)	25 (43,1)	7 (12,1)	0,081
Var	16 (72,7)	5 (22,7)	1 (4,5)	
Anjiyolenfatik invazyon varlığı				
Yok	13 (38,2)	17 (50)	4 (11,8)	-
Var	29 (63)	13 (28,3)	4 (8,7)	

n: birey sayısı; gruplararası istatistik analizi Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

PD-1 C/T varyantının genotip ve allel dağılımları KHDAK hastalarının histopatolojik bulgularına göre değerlendirildiğinde tümör evresi, lenfatik metastaz, uzak metastaz parametreleri genotip ve allel dağılımları ile beraber incelenmiş olup istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.4).

PD-1 C/T gen polimorfizmi sonuçlarına göre, anjiyolenfatik invazyon varlığında küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında CC genotipi taşıma durumu (%63) olup, anjiyolenfatik invazyon yokluğunda CC genotipi taşıma (%38,2) durumuna kıyasla daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,028$, OR:1,649 %95CI:1,019-2,668) (Tablo 4.4).

PD-1 C/T gen polimorfizmi için;anjiyolenfatik invazyon varlığında CC veya TT genotipi taşıma durumu, anjiyolenfatik invazyon yokluğunda homozigot olma durumuna

kıyasla yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,047$, OR:1,435 %95CI:0,979-2,102) (Tablo 4.4).

Perinöral invazyon varlığında PD-1 C/T gen polimorfizmi için küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında CC genotipi (%72,7) taşıma durumu, perinöral invazyon yokluğunda CC genotipi taşıyan hastalara kıyasla (%44,8) daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,026$, OR:1,622 %95CI:1,106-2,380) (Tablo 4.4).

Tablo 4.5: PD-L1 A/C genotiplerinin hastaların patolojik parametreleri ile karşılaştırılması

	PD –L1 A/C			<i>P değeri</i>
	AA	AC	CC	
Tümör evresi				
T3+ T4	9 (37,5)	14 (58,3)	1 (4,2)	-
T1+ T2	21 (37,5)	25 (44,6)	10 (17,9)	
Lenf Nod Metastazı				
N1, N2, N3	10 (32,3)	19 (61,3)	2 (6,5)	-
N0	20 (40,8)	20 (40,8)	9 (18,4)	
Uzak Metastaz				
Yok	28 (35,9)	39 (50)	11 (14,1)	-
Var	2 (100)	-	-	
Perinöral invazyon varlığı				
Yok	22 (37,9)	29 (50)	7 (12,1)	-
Var	8 (36,4)	10 (45,5)	4 (18,2)	
Anjiyolenfatik invazyon varlığı				
Yok	10 (29,4)	20 (58,8)	4 (11,8)	-
Var	20 (43,5)	19 (41,3)	7 (15,2)	

n: birey sayısı; gruplararası istatistik analizi Kikare (χ^2) testi ile gerçekleştirilmiştir.

PD-L1 A/C varyantının genotip ve allel dağılımları KHD AK hastalarının histopatolojik bulgularına göre değerlendirildiğinde tümör evresi, lenfatik metastaz, uzak metastaz, perinöral invazyon ve anjiyolenfatik invazyon varlığı genotip ve allel dağılımları ile beraber incelenmiş olup istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.5).

Çalışma grubuna ait KHDAK'lı hastaların klinik ve patolojik bulguları ise Tablo 4.6'daki gibi deteylandırılmıştır.

Tablo 4. 6:Hastaların Klinik ve Patolojik Özellikleri

Parametreler	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser Hastaları
Tümör Derecesi	
T1	30 (37,5)
T2	26 (32,5)
T3	20 (25)
T4	4 (5)
Lenf Nod Metastazı	
No	49 (61,2)
N1	27 (33,8)
N2	4 (5)
Uzak Metastaz	
Var	2 (2,5)
Yok	78 (97,5)
Histolojik tip	
Skumöz Hücreli	34 (44,2)
Adenokarsinom	32 (41,6)
Diğer	11 (14,3)
Perinöral İnvazyon Varlığı	
Var	22 (27,5)
Yok	58 (72,5)
Anjiyolenfatik invazyon	
Var	46 (57,5)
Yok	34 (42,5)

Tablo 4. 7: Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları ve sağlıklı kontrollerde serum PD-1 düzeyleri

Parametre	KHDAK hastaları	Sağlıklı Kontroller	<i>P değeri</i>
	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD	
Serum PD 1	53,95 ± 17,72	45,19 ± 15,94	= 0,121

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SD$ (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında serum PD-1 düzeyleri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında ($53,95 \pm 17,72$) olup kontrol grubuna kıyasla ($45,19 \pm 15,94$) daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,121$) (Tablo 4.7).

Tablo 4. 8: PD 1.5 C/T genotiplerine göre hasta ve kontrollerde PD 1 düzeyleri

	GENOTİPLER PD-1 C/T					
	CC		CT		TT	
PD-1 düzeyleri (ng/L)	ortalama $\pm$ SD	P değeri	ortalama $\pm$ SD	P değeri	ortalama $\pm$ SD	P değeri
KHDAK Hastaları	$54,29 \pm 14,19$	0,008	$53,56 \pm 21,9$	0,905	-	-
Sağlıklı Kontroller	$39,48 \pm 1,38$		$50,69 \pm 18,87$		$34,48 \pm 6,07$	

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SD$ (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında serum PD-1 düzeyleri, CC genotipi taşıyan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında ($54,29 \pm 14,19$) olup; CC genotipi taşıyan kontrol grubuna kıyasla ($39,48 \pm 1,38$) daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur. ($p=0,008$) (Tablo 4.8).

Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarına ait kendi aralarında yapılan değerlendirmede, serum PD-1 düzeyleri ve genotipler arası dağılım bakımından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p=0,935$).

Benzer şekilde; kontrol grubu kendi aralarında serum PD -1 düzeyleri ve genotipler arası dağılım açısından incelendiğinde, aradaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,079$).

Tablo 4. 9:Hastaların patoloji bulguları ve serum PD-1 düzeyleri

PD-1 düzeyleri(ng/L)	Ortalama $\pm$ SD	p-değeri
Tümör derecesi		
T3+ T4	62,35 $\pm$ 17,84	0,298
T1+ T2	50,94 $\pm$ 17,31	
Nod Metastazı varlığı		
N1, N2, N3	59,44 $\pm$ 17,07	0,206
N0	49,95 $\pm$ 17,87	
Perinöral invazyon		
Var	57,12 $\pm$ 19,59	0,778
Yok	49,58 $\pm$ 14,89	
Anjiyolenfatik invazyon		
Var	55,05 $\pm$ 18,12	0,491
Yok	44,54 $\pm$ 14,13	

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SD$ (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir

PD-1 serum seviyesi KHDAK hastalarının histopatolojik bulgularına göre değerlendirildiğinde tümör evresi, nod metastaz varlığı, perinöral invazyon, anjiyolenfatik invazyon varlığı açısından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 4.9).

PD-1 serum seviyesi KHDAK hastalarının histopatolojik bulgularına göre değerlendirildiğinde tümör evresi, nod metastaz varlığı, perinöral invazyon, anjiyolenfatik invazyon varlığı genotip ve allel dağılımları ile birlikte incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 4.10).

Küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları tümör evrelerine göre I+II ve III+IV olarak gruplandığında, CC ve CT genotiplerine göre sırasıyla serum PD-1 düzeyleri erken tümörler için (52,51 $\pm$ 10,43), (48,86 $\pm$ 24,86) ve ileri evre tümörlerde ise (61,45 $\pm$ 30,38), (62,95 $\pm$ 13,18) ng/L olarak saptanmıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10:Hastaların patoloji bulguları ve serum PD-1 düzeylerin Genotiplere Göre Dağılımı

Patametreler	CC	<i>P değeri</i>	CT	<i>P değeri</i>	TT	<i>P değeri</i>
Tümör Evresi mean $\pm$ (SD)						
T3+T4	61,45 $\pm$ 30,38	p >0,05	62,95 $\pm$ 13,18	p >0,05	-	-
T1+T2	52,51 $\pm$ 10,43		48,86 $\pm$ 24,86		-	
Nod Metastazı varlığı mean $\pm$ (SD)						
N+	61,80 $\pm$ 17,68	p >0,05	57,07 $\pm$ 17,79	p >0,05	-	-
N-	42,29 $\pm$ 9,99		50,75 $\pm$ 25,93		-	
Perinöral invazyon mean $\pm$ (SD)						
Var	53,79 $\pm$ 16,08	p >0,05	62,94 $\pm$ 26,29	p >0,05	-	-
Yok	55,46 $\pm$ 11,32		46,06 $\pm$ 16,81		-	
Anjiyolenfatik İnvazyon mean $\pm$ (SD)						
Var	54,29 $\pm$ 14,19	-	56,13 $\pm$ 23,9	p >0,05	-	-
Yok	-		44,54 $\pm$ 14,13		-	

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SD$ (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında serum egf düzeyi karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi analizi ve Mann-Whitney U analizi ile gerçekleştirilmiştir

PD-1 C/T ve PD-L1 A/C polimorfizmlerine ait genotip kombinasyonları incelendiğinde, kontrol grubu CTAC kombine genotip taşıma durumu (%34,2) küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarının taşıma durumundan (%17,5) daha yüksek bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,016, OR:0,512 %95CI:0,291-0,902) (Tablo 4.11).

CCAA kobine genotip taşıma durumu incelendiğinde, KHDAK hastalarında (%20) kontrol grubuna kıyasla (%10,1) daha yüksek oranda tespit edilmiş olup aradaki farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4. 11:Çalışma Gruplarına Ait PD-1 ve PD-L1 Kombine Genotiplerinin Analizi

	PD-1 ve PD-L1 Kombine Genotip								
	CCAA n(%)	CCAC n(%)	CCCC n(%)	CTAA n(%)	CTAC n(%)	CTCC n(%)	TTAA n(%)	TTAC n(%)	TTCC n(%)
Hasta n=80	16 (20)	21(26,2)	5(6,2)	12(15)	14(17,5)	4 (5)	2 (2,5)	4 (5)	2 (2,5)
Kontrol n=79	8(10,1)	16(20,3)	6(7,6)	10(12,7)	27(34,2)	4 (5,1)	0 (0)	7 (8,9)	1 (1,3)

Çoklu Lojistik Regresyon Analiz Sonucu

Çalışma sonunda yapılan çoklu regresyon analiz sonrasında cinsiyet, sigara kullanımı, PD-L1 AA genotip taşıma durumu birlikte incelenmiştir. Bu analizler sonrasında cinsiyetin tek başına etkili bir faktör olmadığı görülmüş olup; sigara kullanımının gerek hastalığın riski gerekse de hastalığın progresyonunda değerlendirilebilir önemli parametrelerden olduğu saptanmıştır.

PD-1 C/T polimorfizmi için KHDAK hastalarında anjiyolenfatik invazyon ve perinoral invazyon varlığında CC genotipinin anlamlılığı ve anjiyolenfatik invazyon varlığında CT genotipinin anlamlılığı açısından hastaların kendi içinde sigara kullanımında anlamlı farklılık olmadığından lojistik regresyon analizi uygulanmamıştır.

4.5. Western Blot Analizine Ait Bulgular

16 KHDAK hastasından alınan doku örnekleri Western Blot ile incelenmiş ve tümör mikroçevresindeki PD-L1 molekülünün ekspresyon durumu primer tümör ve normal doku örneklerinde istatistiksel olarak ayrı ayrı analiz edilmiştir (Tablo 4.12). Tümör mikroçevresinde araştırılan PD-L1 ekspresyonunu pozitif veya negatif olan hasta gruplarında yüzde oranları ile birlikte göstermektedir.

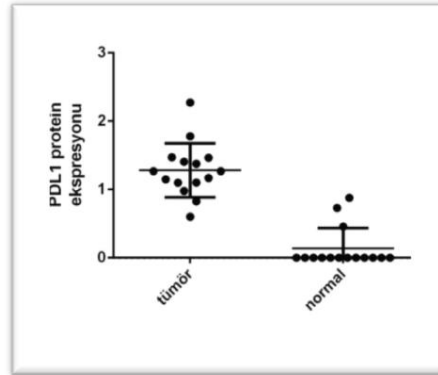
Tablo 4.12:KHD AK Hastalarında Western Blot yöntemi ile protein ekspresyonlarının analizi (n=16)

PD-L1	Pozitif		Negatif	
	mean $\pm$ (SD)	n(%)	mean $\pm$ (SD)	n(%)
Tümörlü Doku	0,95 $\pm$ 0,68 *	12 (75)	-	4 (25)
Normal Doku	0,13 $\pm$ 0,28 *	3 (18,8)	-	13 (81,2)

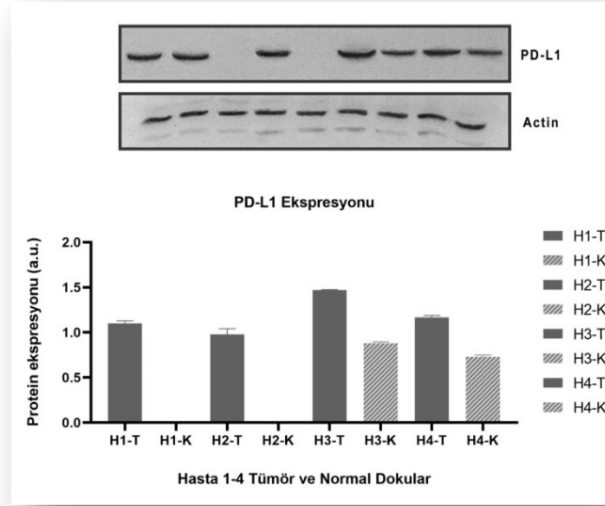
Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SD$ (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında protein düzeyleri karşılaştırılması paired-T Test analizi ile gerçekleştirilmiştir. * $p < 0,0001$

Tümörlü dokuda PD-L1 molekülü 12 hastada %75 oranında görülürken, normal dokuda sadece 3 hasta %18,8 oranında tespit edilmiştir. Tümörlü dokuda hedef moleküle ait (**0,95 $\pm$ 0,68**) ekspresyon değeri normal dokuda bulunan ekspresyon değeri ile karşılaştırıldığında (**0,13 $\pm$ 0,28**) aradaki farklılık istatistiksel açıdan ileride derecede anlamlı bulunmuştur($p < 0,0001$)(Tablo 4.12) (Şekil 4.7).

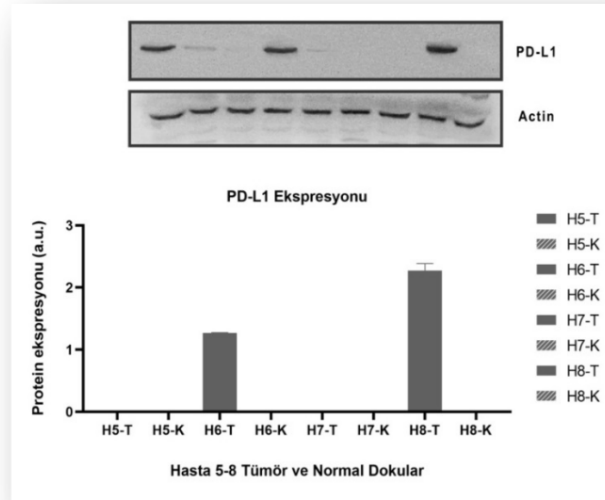


Şekil 4. 7: KHD AK Hastalarında PD-L1 protein ekspresyonu analizi



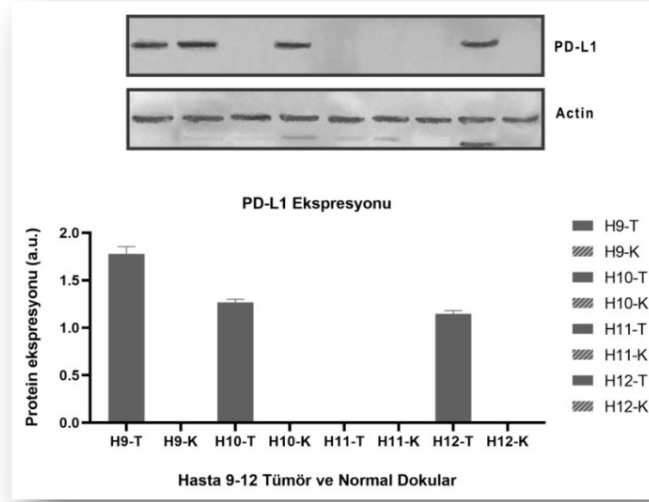
Şekil 4. 8: KHDAC hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 1-4)

KHDAC primer tümör dokularında ve Hasta 1 (H1-T, H1-K), Hasta 2 (H2-T, H2-K), Hasta 3 (H3-T, H3-K) ve Hasta 4'ün (H4-T, H4-K) kontrol dokularında PD-L1 ekspresyonunun analizi Şekil 4.8'de belirtildiği gibidir. Bakılmak istenen PD-L1 molekülünün ekspresyonu, beta aktin miktarlarına oranlanarak hesaplandı. Bantların alan analizleri ImageJ® ve GraphPad Prism 8.2.0. programı kullanılarak yapılmıştır



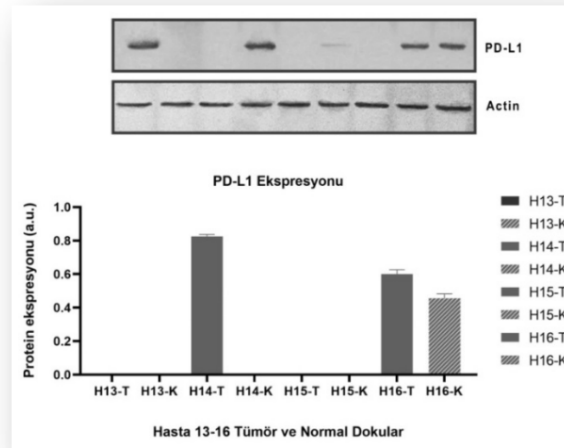
Şekil 4. 9: KHDAC hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 5-8)

KHDAK primer tümör dokularında ve Hasta 5 (H5-T, H5-K), Hasta 6 (H6-T, H6-K), Hasta 7 (H7-T, H7-K) ve Hasta 8'ün (H8-T, H8-K) kontrol dokularında PD-L1 ekspresyonunun analizi Şekil 4.9'de belirtildiği gibidir.



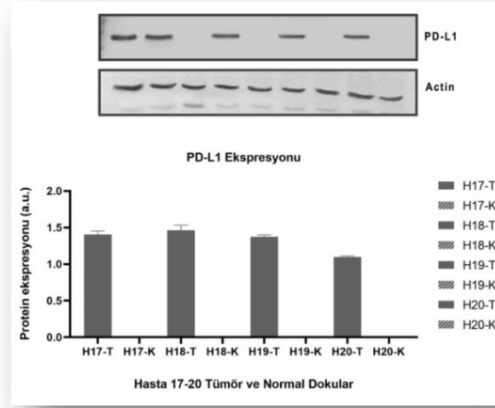
Şekil 4.10:KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 9-12)

KHDAK primer tümör dokularında ve Hasta 9 (H9-T, H9-K), Hasta 10 (H10-T, H10-K), Hasta 11 (H11-T, H11-K) ve Hasta 12'ün (H12-T, H12-K) kontrol dokularında PD-L1 ekspresyonunun analizi Şekil 4.10'de belirtildiği gibidir.



Şekil 4. 11:KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 13-16)

KHDAK primer tümör dokularında ve Hasta 13 (H13-T, H13-K), Hasta 14 (H14-T, H14-K), Hasta 15 (H15-T, H15-K) ve Hasta 16'nın (H16-T, H16-K) kontrol dokularında PD-L1 ekspresyonunun analizi Şekil 4.11'de belirtildiği gibidir.



Şekil 4.12: KHDAK hastalarında tümör dokuda PD-L1 Protein Ekspresyonu (Hasta 17-20)

KHDAK primer tümör dokularında ve Hasta 17 (H17-T, H17-K), Hasta 18 (H18-T, H18-K), Hasta 19 (H19-T, H19-K) ve Hasta 20'nin (H20-T, H20-K) kontrol dokularında PD-L1 ekspresyonunun analizi Şekil 4.12'de belirtildiği gibidir.

Tümörlü dokularda Western Blot yöntemi ile PD-L1 ekspresyonu, hastaların klinik ve patolojik özelliklerine göre incelendiğinde; erken tümör evresinde (T1+T2) bulunan değer $1,01 \pm 0,79$ ileri tümör evresi (T3+T4) ile kıyaslandığında $0,85 \pm 0,47$ daha yüksek bulunmuş olup aradaki farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,428$) (Tablo 4.13).

Benzer şekilde, anjiyolenfatik invazyon varlığında $1,06 \pm 0,63$ olarak bulunan değer anjiyolenfatik invazyon görülmeyen tümörlü dokularda daha düşük olup $0,49 \pm 0,85$ olarak bulunmuştur. Aradaki farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,439$) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13:Tümörlü dokularda PD-L1 ekspresyonunun hastaların klinik ve patolojik özelliklerine göre incelenmesi

Patametreler	Tümör Dokusu Protein Ekspresyonu mean $\pm$ (SD)	<i>P değeri</i>
Tümör Evresi		
T3+T4	6 (0,85 $\pm$ 0,47)	p=0,428
T1+T2	10 (1,01 $\pm$ 0,79)	
Nod Metastazı varlığı mean $\pm$ (SD)		
N+	8 (0,82 $\pm$ 0,73)	p=0,721
N-	8 (1,08 $\pm$ 0,64)	
Uzak Metastaz		
Var	1 (1,15)	p=1
Yok	15 (0,94 $\pm$ 0,7)	
Perinöral invazyon mean $\pm$ (SD)		
Var	8 (1,04 $\pm$ 0,65)	p=0,959
Yok	8 (0,86 $\pm$ 0,74)	
Anjiyolenfatik İnvazyon mean $\pm$ (SD)		
Var	13 (1,06 $\pm$ 0,63)	p=0,439
Yok	3 (0,49 $\pm$ 0,85)	

Tablodaki değerler $\bar{X} \pm SD$ (Standard Deviasyon) olarak verilmiştir.

*Çalışma grupları arasında protein düzeyleri karşılaştırılması paired-T Test analizi ile gerçekleştirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Agresif tümörbüyümesinin immün düzenlenmesinde genellikle immün kontrol noktalarının aktivasyonu ile efektör immün yanıtı inhibe eden ligandların blokajı işlev görmektedir. Kontrolsüz büyüyen tümör hücreleri invazyon sürecinde, zorlu konak ortamında hayatta kalmak ve kronik enflamasyon bölgelerinde çoğalmak için moleküler mekanizmalar geliştirmektedirler [81]. Anjiyogenezi destekleyen ve çevre sağlıklı doku yapısını bozan tümör büyüme faktörleri, metastatik yayılmayı teşvik ederler. Bağışıklık sisteminin merkezi rolü ise kontrolsüz hücre bölünmesinin engellemesi de dahil yabancı antijenleri yok etmektir [82]. İlk tümör büyümesi; doğuştan ve kazanılmış immün yanıtlarla tespit edilip yok edilirken, immün sistem efektör hücrelerinin engellenmesi yada tümör hücresi immün kaçıışı sağlayan yüzey moleküllerinin ekspresyonu ile kanser hücreleri immün gözetimden kaçabilmektedirler [83, 84]. Tümör hücreleri sitotoksik T-lenfosit aktivitesini inhibe edecek ligandlarını hücre yüzeyinde sentezleyerek T hücre inaktivasyonuna neden olurken kanser hücrelerinin de immün yanıtta kaçışına ve proliferasyonuna sebep olurlar [83, 85, 86]. Günümüzde immünoterapideki son çalışmalar; tümör hücresi immün kaçış mekanizmaları üzerine yoğunlaşmıştır [87].

Normal koşullar altında; immün kontrol noktaları, immün hücrelerde eksprese edilen, enflamatuar yanıt sırasında oluşabilecek periferik otoimmüniteyi önleyen hücre yüzeyi reseptörleridir [88]. Moleküler bir tedavi yaklaşımı olarak immün kontrol noktalarının bloke edilmesi, tümör hücresi ile T hücresi arasında oluşan tümöre spesifik T-hücre yanıtının artışı ile sonuçlanmaktadır [89]. Klinik çalışmalar, immünoterapinin kanser tedavisinde güçlü bir anti-tümör immün yanıt oluşturabildiği ve sağkalımı artırarak etkilerinin olabildiğini göstermiştir [90].

Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1), immün hücreler üzerinde eksprese edilen ve periferik dokularda ve tümör mikro çevresinde olgun T hücre yanıtı üzerinde immünsüpresif etkiler gösteren inhibitör bir reseptördür. Diğer bir deyişle PD-1, T hücresi enflamatuar yanıtını baskılayan ve otoimmüniteyi sınırlayan hücre yüzey glikoproteinlerdendir. PD1 ve tümör hücre yüzeyinde eksprese olunan (PD-L1) ligandı arasındaki PD-L1/PD1 bağlantısı, T hücre aktivasyonunu azaltan hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederek, tümör immünitesinin azalmasına sebep olmaktadır [91]. PD-1/PD-L1 bağlantısının bloke edilmesi ile CD8 T hücrelerinin çoğalması ve efektör sitokinlerin üretimi

gibi T hücre yanıtı arttırıldığından, klinik çalışmalarda KHDAK dahil çeşitli kanser tiplerinde tedavide iyi prognoz tablosu izlenmektedir[92].

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) insan genomundaki en yaygın genetik varyasyon türlerinden biridir. DNA üzerinde yanlış-eşleşme (mismatch) tamiri, hücre döngüsünün düzenlenmesi, metabolizma ve bağışıklığı düzenleyen genlerdeki SNP'ler, kansere karşı genetik duyarlılıkla ilişkili bulunmuştur. Kanser patogenezindeki genetik varyantların protein fonksiyonunu ve bireyin kansere duyarlılığını değiştirebileceği günümüzde iyi bilinmektedir[93][94-96].Kanser duyarlılığına neden olan SNP'lerin genetik ve epigenetik mekanizmalarının anlaşılması, kanser tiplerinin moleküler patogenezinin anlaşılmasında kritik öneme sahiptir.Klinik açıdan, SNP'ler birçok kanser türünde potansiyel teşhis ve tedavi edici biyobelirteçler olarak kabul edilmektedirler [93].

Çalışmamızda değerlendirilen, ekson 5'de (pozisyon 7785) bulunan PD-1 C/T önemli polimorfizmlerden biri olarak görülmektedir[97]. Birçok kanser ve otoimmün hastalıklardaPD-1 polimorfizmi ile ilgili farklı çalışmalar vardır [98, 99]. Fonksiyonel olarak protein değişimi yaratmayan PD-1 C/T polimorfizmi,amino asit dizisinde değişiklik oluşturmayan AlanindenAlanine (Ala/Ala) olan dönüşümü ifade etmektedir. Fakat PD-1 gen transkripsiyonunu veya aktivitesini düzenleyen PD-1 genindeki diğer tek nükleotid polimorfizmleriyle birlikte, genin ekspresyonunda veya fonksiyonunda bir değişikliğe yol açabildiği düşünülmektedir [100].

Mojtahedi ve ark. yaptığı çalışmada PD-1 C/T polimorfizmi ile kolon kanseri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve hasta grubunda CT genotipinin görülme sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.CT genotip taşıyıcılığının hastalığa yakalanma riskiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir [101].

Diğer taraftan Hua ve ark. yaptığı bir çalışmada; PD-1 lokusundaki CT heterozigotluğunun meme kanseri vakalarında kontrollere kıyasla daha düşük bir sıklıkta görüldüğü ($p=0.004$) tespit edilmiş ve CC genotip ve C alel sıklığı meme kanseri vakalarında daha yüksek bulunmuştur ($p=0.003$ ve $p=0,010$). Çalışma sonuçlarına göre CC genotipi ve C allel taşıyıcılığının meme kanserinde potansiyel risk faktörlerinden olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan, kontrol grubunda yüksek bulunan T allel taşıyıcılığının da artmış T hücre aktivitesi ile ilişkili olabileceğive hastalığa yatkınlığı azaltan bir etkisinin olabileceği belirtilmiştir [102].

F. Namavar Jahromi ve ark. tarafından 2017 yılında benign, malign beyin tümörleri ile PD-1 C/T polimorfizmi arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada; hasta ve kontrol grupları arasında önemli farklılıklar bulunmuş olup, hastalarda CC genotip görülme sıklığının düşük, CT genotipinin ise kontrol grubuna kıyasla yüksek frekansta bulunduğu tespit edilmiştir. Mojtahedi ve ark. yaptığı çalışmaya benzer bir sonuçla; CT genotipinin hastalığa ait bir risk parametresi olabileceği ifade edilmiştir [103].

Liu Yin ve ark. tarafından yürütülen başka bir çalışmada; KHDAK hastalığı ve PD-1 C/T polimorfizmi arasındaki ilişkide; CC+CT taşıyıcılığının TT genotipine kıyasla görülme sıklığının hastalarda daha yüksek olduğu ($p=0.003$) bulunmuştur. Ayrıca TNM evrelemesi sonucuna göre C allel taşıyıcılığının ileri evre KHDAK hastalığı ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir ($p=0.03$). Hua ve ark. sonuçlarına benzer şekilde, C allel taşıyıcılığının hastalığın risk parametrelerinden biri olduğu belirtilmiştir ($p=0.006$) [104].

Daha önce yaptığımız bir çalışmada PD-1 C/T polimorfizmi; kolorektal kanserli hastalarda genotip ve allel dağılımı açısından değerlendirildiğinde anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda; Mojtahedi ve ark. sonuçlarına benzer şekilde, hastalar arasında CT genotipinin görülme sıklığı kontrollere kıyasla anlamlı derece yüksek olup, CT genotipinin risk parametrelerinden biri olduğu bulunmuştur. Patolojik parametrelere göre incelendiğinde; uzak metastaz varlığı görünen hastalarda C alleli ve CT genotipini taşımak uzak metastaz görülmeyen hastalara kıyasla daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca anjiyolenfatik invazyon varlığında yine C alleli anjiyolenfatik invazyon görülmeyen hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.043$). Sonuçlara göre, PD-1 C/T tek nükleotid değişiminin kolorektal kansere ait hem risk hemde prognostik faktörlerden biri olabileceği öngörülmüştür [105].

Bu çalışmamızda ise, PD-1 C/T gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde genotip ve allel dağılımı açısından çalışma grubumuz incelendiğinde kontrol grubu ve küçük hücreli dışı akciğer kanser hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.157, p=0.163$). Çalışma sonuçları patolojik parametrelere göre incelendiğinde; anjiyolenfatik invazyon varlığında hastalarda, CC genotipi taşıma durumu (%63) olup anjiyolenfatik invazyon görülmeyen hastalara kıyasla (%38,2) daha yüksek tespit edilmiştir. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,028$). Ayrıca; anjiyolenfatik invazyon varlığında CC veya TT genotipi taşıma durumu, anjiyolenfatik invazyon yokluğunda homozigot olma durumuna kıyasla yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,047$). Prognosa etki eden diğer bir

parametre olan perinöral invazyon varlığında;CC genotipi (%72,7) taşıma durumu, perinöral invazyon yokluğunda CC genotipi taşıyan hastalara kıyasla (%44,8) daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,026$).

PD-L1 A/C gen polimorfizmi sonuçları değerlendirildiğinde genotip ve allel dağılımı açısından çalışma grubumuz incelendiğinde; KHDAK hastaları ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.113$, $p=0,178$). Fakat yapılan değerlendirmede, KHDAK hastalarında A allel frekansının (%61,8) kontrol grubuna göre (%54,43) yüksek olduğu, C allel frekansının ise kontrol grubunda (%45,57) hasta grubuna göre (%38,12) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca; AA genotipi taşıma durumu hastalarda (%37,5) olup kontrollere kıyasla (% 22,8)daha yüksek bulunmuştur. Aradaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0.043$).

Yuan ve ark. tarafından 528 KHDAK hastası ve 600 kontrol üzerinde yapılan PD-L1 A/C gen polimorfizmi çalışmasında; AC genotip taşıma ve C allel sıklığı KHDAK hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0.006$, $p=0.004$). Çalışmanın patolojik verilerine göre; C allel taşıyan KHDAK hastalarında, A alleli taşıyan hastalara kıyasla daha fazla lenf nod metastazı görülmüştür ($P<0.001$). C allel taşımanın KHDAK hastalığına yakanlanma ve prognostik olarak lenf nod metastazı riskini arttırabileceği ifade edilmiştir [106].

Yan-bin CHEN ve ark. tarafından KHDAK hastalığı üzerinde yapılan diğer bir çalışmada Yuan ve ark. benzer sonuçlar elde edilerek; hasta ve kontrol gruplarında, genotip dağılımları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.013$). C allel taşıyıcılığının hastalığı artırıcı etkisinin olduğu öngörülmüşken, A allel frekansının ise kontrollerde daha yüksek olduğu ve hastalığa karşı koruyucu etkisinin olabileceği vurgulanmıştır ($p=0.003$) [107].

Sensen Cheng ve ark. yaptığı başka bir KHDAK hastalığı çalışmasında benzer şekilde; hastalarda C allel frekansının kontrollere kıyasla daha yüksek olduğu ve hastalığa ait bir risk parametresi olabileceği öngörülmüştür ($p=0.002$)[108].

PD-1 C/T ve PD-L1 A/C polimorfizmlerine ait genotip kombinasyonları incelendiğinde, kontrol grubu CTAC kombine genotip taşıma durumu (%34,2) küçük hücreli dışı akciğer kanser hastalarının taşıma durumundan (%17,5) daha yüksek bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,016$). Buna göre çalışmamızda, CTAC kombine genotip taşıma durumunun hastalığa karşı koruyucu bir etki gösterebileceği öngörülmektedir. Lee ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; PD-1 ve PD-

L1'in fonksiyonel polimorfizmi ve sonuçlarının birlikte değerlendirilmesinin erken evre KHDAK'de prognoz izlenmesinde önemli olduğunu ifade etmişlerdir [109].

Mohammad Hashemi ve ark. tarafından 2019 yılında PD-1 C/T ve PD-L1 A/C polimorfizmlerinin risk boyutunda birlikte incelendiği meta analizde; PD-1 C/T polimorfizminin gastrointestinal kanser, akciğer kanseri ve meme kanseri riskini önemli ölçüde azalttığı ve sonuç olarak PD-1 C/T gen varyantının kansere karşı koruyucu etkisinin olabileceği ifade edilirken; PD-L1 A/C değişiminin akciğer kanser riskini artıran bir etki gösterdiğine işaret edilmiştir [110].

Serum PD-1 düzeyleri incelendiğinde; KHDAK hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında serum PD-1 düzeyleri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki farklılık istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır ($p=0,121$). Gerek hasta grubu gerekse kontrol grubu kendi aralarında yapılan değerlendirmede, serum PD-1 düzeyleri bakımından anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu serum PD-1 düzeyleri genotip dağılımları ile birlikte incelendiğinde; CC genotipi taşıyan hastalarda kontrol grubuna kıyasla PD-1 düzeyleri daha yüksek tespit edilmiş olup, aradaki fark istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p=0,008$).

Birkaç klinik çalışma, sPD-1'in prediktif rolünü değerlendirmek için kandaki sPD-1 düzeyi ile patolojik özellikler arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Hsiang-Yun Cheng ve ark. tarafından yapılan çalışmada, artmış serum PD-1 düzeylerinin hepatosellüler kanser riskinde artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Özellikle erkeklerde artmış PD-1 düzeyinin (>282 pg/mL) hastalığa yakalanma riskini 2 kat artırıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada artmış PD-1 düzeylerinin bozulmuş T hücre bağışıklığı ile ilgili olabileceği öngörülmüştür [111].

ES.F. Sorensen ve ark tarafından yapılan çalışmada; EGFR mutasyonlu hastalarda erlotinib tedavisinden önce ve tedavi boyunca sPD-1 konsantrasyonu hastalığın progresyonu ve hasta sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Tedavi boyunca serum PD-1 düzeylerinin arttığı ve bu artışın hastalığa ait progresyonu azalttığı ve uzamış sağ kalımla ilişkili olduğu belirtilmiştir ($p=0.006$) [112].

P. Zhang ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, oral skuamöz hücreli karsinom ve serum PD-1 düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmış fakat hasta ve kontrol grupları

arasında sPD-1 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılığa rastlanmamıştır ($p > 0.05$) [113].

Western Blot analiz sonuçlarımız incelendiğinde; tümörlü dokuda PD-L1 molekülü 12 hastada %75 oranında görülürken, normal dokuda sadece 3 hasta %18,8 oranında tespit edilmiştir. Tümörlü dokuda PD-L1 ekspresyon değeri normal doku ekspresyon değeri ile karşılaştırıldığında yüksek bulunmuş olup, aradaki farklılık istatistiksel açıdan ileride derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). Çalışma sonucuna göre; tümörlü dokuda yükselmiş PD-L1 değeri, hedef molekülün KHDAK hastalığında prognostik bir değerinin olduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan, tümörlü dokularda hastaların klinik ve patolojik özelliklerine göre incelenen PD-L1 ekspresyonunda, her ne kadar erken evre KHDAK hastalığında PD-L1 ekspresyon değeri yüksek olsada, istatistiksel olarak bir farklılık ortaya konulamamıştır.

Paulsen ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada histopatolojik olarak incelenen PD-1 ve PD-L1 molekülünün, çalışmamızla uyumlu olarak hastalığın patolojisine etkisinden bahsedilmiştir ve her iki molekülün birlikte değerlendirilmesinin TNM evrelemesi ve hastalığın prognozunda belirleyici olabileceği ifade edilmiştir [114].

Monsó ve ark. KHDAK'de histopatolojik ve moleküler bulgular odaklı yürüttükleri çalışmada TNM sınıflamasının; prognoz ve evre I/II KHDAK'de öngörülebilirlik açısından geliştirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Çalışma sonucuna göre literatürlerle uyumlu olarak, PD-L1 ekspresyon seviyesi ve sağ kalım arasında bir korelasyon olduğu ifade edilmiştir [114].

Lafuente-Sanchis ve ark. PD-L1 ve PD-1 gen ekspresyonunun önemini ortaya koymak için 78 hasta ile yürüttükleri bir çalışmada; PD-L1 gen ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, sigara içme alışkanlıkları, histolojik tip, patolojik evre veya KHDAK olgularında tümör farklılaşması açısından istatistiksel bir fark ortaya konulamamış olsada çalışma verilerine göre; PD-L1 aşırı ekspresyonunun düşük hayatta kalma oranı ve yüksek tümör farklılaşması ile ilişkili olabileceği görüşünü ifade etmişlerdir [115].

Özlem Durak ve ark. tarafından meme kanserinde PD-L1 ekspresyonunun incelendiği çalışmada; Tümör çapı 20 mm ve altında olan tümörlerde PDL1 pozitifliği %20,5, çapı 20 mm'den büyük ancak 50 mm veya daha küçük olan tümörlerde %22,2, çapı 50 mm'den daha büyük olan tümörlerde %25 oranında saptandı. [116]. Büyük çaptaki tümörlerde PDL1 pozitiflik oranında artış görülmekle birlikte Lou ve ark. çalışmasında olduğu gibi istatistiksel olarak

anlamalı ilişki bulunamamıştır [117]. Bertucci ve ark., Sabatier ve ark., Muenst ve ark. yaptıkları çalışmalarda ise büyük tümör çapı ile PDL1 ekspresyonu arasında istatistiksel açıdan anlamlı ilişki tespit edilmiştir [118-120]. Ek olarak, bu çalışmalar tümörlerde daha yüksek PDL1 ekspresyonunun tümör evresinin ilerlemesini ve dokuların daha derinine invazyonunu kolaylaştırabileceğini düşündürmektedirler.

Çalışma sonunda yapılan çoklu regresyon analiz sonrasında cinsiyet, sigara kullanımı, PD-L1 AA genotip taşıma durumu birlikte incelenmiştir. Bu analizler sonrasında cinsiyetin tek başına etkili bir faktör olmadığı görülmüş olup; sigara kullanımının gerek hastalığın riski gerekse de hastalığın progresyonunda değerlendirilebilir önemli parametrelerden olduğu saptanmıştır.

Çalışma kısıtlılıklarımızdan sayılan hasta sayımızın yetersiz olması sebebi ile elde ettiğimiz bu sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesi adına hasta örneklem genişliğinin artırılarak çalışmaya devam edilmesi gerekliliklerimizdendir.

Sonuçlarımız, PD-1 ve PD-L1 genlerine ait moleküler çalışmaların KHDAK hastalığı patogenezinin ortaya konulmasında önemli bir rol oynadıkları görüşünü desteklemektedir. Verilerimiz, KHDAK hastalığı tanı, tedavi ve patogenezinin aydınlatılması veya terapötik değeri açısından değerlendirilmesi konusunda yapılacak çalışmaları destekleyici niteliktedir. Kişiye özel tedavinin sıklıkla ifade edildiği son dönemlerde PD-1 ve PD-L1 sinyal yolağının aydınlatılmasının, onkogenik süreçlerdeki fonksiyonunun belirlenmesi ve yeni tedavi stratejilerinin oluşturulması açısından da klinik araştırmalara önemli katkılar sağlayacağına inanmaktayız.

Araştırmamız, PD-1 ve PD-L1 sinyal yolağının birlikte analiz edilmesinin önemi ortaya koymak açısından; KHDAK hastalarında PD-1 C/T ve PD-L1 A/C gen polimorfizmlerinin kombinasyonlarının incelenerek, sPD-1 düzeylerinin PD-1 C/T polimorfizmi ile birlikte analizini yapan ve PD-L1 molekülünü aynı hasta grubunda protein düzeyinde inceleyen ilk araştırma niteliğinde olması ile özgün bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Kanitkar, A.A., et al., Causes of death in long-term survivors of non-small cell lung cancer: A regional Surveillance, Epidemiology, and End Results study. *Ann Thorac Med*, 2018. 13(2): p. 76-81.
2. Kargi, A., et al., Increased serum S-TRAIL level in newly diagnosed stage-IV lung adenocarcinoma but not squamous cell carcinoma is correlated with age and smoking. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013. 14(8): p. 4819-22.
3. Barbaros B.,Dikmen M.,Kanser İmmünoterapisi Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(4):177-181
4. Wayteck L., Breckpot K., Demeester J., De Smedt S. C., Raemdonck K., A Personalized View on Cancer Immunotherapy, *Cancer Letters*, 352(2014), 113-125, 2013.
5. Aslan G., Tümör İmmünolojisi, *Türk. J. Immunol.*, 15(1), 7-13, 2010
6. Salmaninejad, A., et al., PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol*, 2019. 234(10): p. 16824-16837.
7. Ohaegbulam, K. C., Assal, A., Lazar-Molnar, E., Yao, Y., & Zang, X. (2015). Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PDL1 pathway. *Trends in Molecular Medicine*, 21(1), 24–33.
8. Akbulut H, Akbulut KG.(1997).Karsinogenez In:İçli F, ed. Tıbbi Onkoloji Ankara,ANTİP Afi Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınlar,23-38.
9. Lecture GFF.(1996).Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors.*Chest*,109(Suppl),14S-19S.
10. Li, Z.; Li, N.; Zhu, Q.; Zhang, G.; Han, Q.; Zhang, P.; Xun, M.; Wang, Y.; Zeng, X.; Yang, C.; et al. Genetic variations of PD1 and TIM3 are diferentially and interactively associated with the development of cirrhosis and HCC in patients with chronic HBV infection. *Infect. Genet. Evol.* 2013, 14, 240–246.
11. Hua, Z.; Li, D.; Xiang, G.; Xu, F.; Jie, G.; Fu, Z.; Jie, Z.; Da, P.; Li, D. PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011, 129, 195–201
12. Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res.* 2002;7:271-306.
13. Omran AR. The epidemiologic transition. A theory of the epidemiology of population change. *Milbank Mem Fund Q.* 1971;49:509-538.

14. Howlader N, Noone A, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations) based on November 2011 SEER data submission. Bethesda, MD; National Cancer Institute:2012.
15. Ettinger DS. Ten years of progress in non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012;10(3):292-295.
16. Travis, W. D., Brambilla, E. & Riely, G. J. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 31,992–1001 (2013).
17. Gridelli, C., et al., Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15009.
18. Bray, F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394-424.
19. Gridelli, C., et al., Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2015. 1: p. 15009.
20. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386 (2014).
21. Alberg, A.J., et al., Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2013. 143(5 Suppl): p. e1S-e29S.
22. Halilçolar H, Tatar D, Ertuğrul G ve ark. Epidemiyoloji. In: Akkoçlu A, Öztürk C; eds. Akciğer kanseri multidisipliner yaklaşım. *Toraks Kitapları*, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 1999:17-22.
23. U.S. Department of Health and Human Services PHS, Centers for Disease Control and Prevention. vol. 7829. Washington, DC: CDC Publication; 2004. The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General
24. The changing cigarette, 1950-1995. Hoffmann D, Hoffmann I *J Toxicol Environ Health*. 1997 Mar; 50(4):307-64.
25. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis. Akopyan G, Bonavida B *Int J Oncol*. 2006 Oct; 29(4):745-52.
26. Lung cancer in never smokers--a different disease. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct; 7(10):778-90.

27. Çırak K, Tatar D, Özacar R, Halilçolar H. 40 yaş altı akciğer kanseri olgularımız. XXI. Ulusal Türk Tüberküloz ve Göğüs Hastalıkları Kongresi Kitabı 1996; 417-22
28. Centers for Disease, C. and Prevention, Vital signs: current cigarette smoking among adults aged ≥ 18 years --- United States, 2009. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2010. 59(35): p. 1135-40.
29. National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Result Program: Cancer Stat Facts: Lung and Bronchus Cancer. Erişim 13.03.2018 <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
30. Lung cancer in octogenarians. Blanchard EM, Arnaoutakis K, Hesketh PJ J Thorac Oncol. 2010 Jun; 5(6):909-16.
31. National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Result Program: Cancer Stat Facts: Lung and Bronchus Cancer. Erişim 13.03.2018 <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
32. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A CA Cancer J Clin. 2011 Jul-Aug; 61(4):212-36.
33. Spiro SG, Porter JC: Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. Am J Respir Crit Care Med 2002;166:1166-96.
34. Cha Q, Chen Y, Du Y. The trends in histological types of lung cancer during 1980-1988, Guangzhou, China. Lung Cancer 1997;17:219-30
35. IARC (2014) Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–110. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
36. Bosetti, C., P. Boffetta, and C. La Vecchia, Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. Ann Oncol, 2007. 18(3): p. 431-46.
37. Rota, M., et al., Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014. Arch Toxicol, 2014. 88(8): p. 1479-90.
38. IARC (2014). Outdoor air pollution. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 109. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol109/index.php>
39. Hamra, G.B., et al., Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Environ Health Perspect, 2014. 122(9): p. 906-11.

40. Hubaux, R., et al., Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis. *Environ Health*, 2012. 11: p. 89.
41. WCRF/AICR (2007). Food nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, D.C.: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research
42. İtil O. Akciğer kanserlerinin epidemiyolojisi ve etyolojisi. In: Haydaroğlu A; ed. Akciğer kanserleri: Tanı ve tedavi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2000:15-34
43. Sidorchuk, A., et al., Socioeconomic differences in lung cancer incidence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control*, 2009. 20(4): p. 459-71.
44. Schwartz KL, Crossley-May H, Vigneau FD, Brown K, Banerjee M. Race, socioeconomic status and stage at diagnosis for five ve common malignancies. *Cancer Causes Control* 2003;14(8):761–766
45. Sriram KB, Larsen JE, Yang IA, et al. Genomic medicine in non-small cell lung cancer: paving the path to personalized care. *Respirology* 2011;16:257-63
46. Sriram KB, Tan ME, Savarimuthu SM, et al. Screening for activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2011;38:903-10.
47. Brennan P, Hainaut P, Boffetta P. Genetics of lung-cancer susceptibility. *Lancet Oncol* 2011;12:399-408
48. Yang, I.A., J.W. Holloway, and K.M. Fong, Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *J Thorac Dis*, 2013. 5 Suppl 5: p. S454-62.
49. Rami-Porta, R. et al. in *ESTS Textbook of Thoracic Surgery* Ch.44.1, 745 –773 (European Society of Thoracic Surgeons, 2014).
50. <http://file.toraks.org.tr/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/mesleki-kurslar-3-ppt-pdf/metingorguner.pdf> (2015)
51. Türk Toraks Derneği. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Rehberi. 2006. Erişim 13.03.2018, http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/astim_tani_ve_tedavi_rehberi.pdf
52. Aydın G. Akciğer Kanserlerinde Tanı Yöntemleri, Türkiye’de Sık Karşılaşılan Hastalıklar, Akciğer Kanserine Güncel Yaklaşım Sempozyum Dizisi 2007; 58: 141- 152.
53. Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, et al. The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2014;9:1618-1624
54. Nicholson AG, Chansky K, Crowley J, et al; The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the

Clinical and Pathologic Staging of Small Cell Lung Cancer in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016; 11:300-31

55. Kilic, M.O., et al., The Role of Ultrasonography in the Assessment of Vocal Cord Functions After Thyroidectomy. *J Invest Surg*, 2018. 31(1): p. 24-28.

56. Senn HJ. Supportive and palliative care in cancer patients. 21st ESMO Congress, Vienna, Austria, November 1-5, 1996.

57. Sgambato, A., et al., Anti PD-1 and PDL-1 Immunotherapy in the Treatment of Advanced Non- Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Review on Toxicity Profile and its Management. *Curr Drug Saf*, 2016. 11(1): p. 62-8.

58. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, et al. Escape of human solid tumors from T-cell recognition:Molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74: 181-273

59. J. Sánchez de Cos Escuín / *Arch Bronconeumol.* 2017; 53(12):682–687

60. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev* 2008; 224: 166-82.

61. Katoh, M., Combination immuno-oncology therapy with pembrolizumab, an anti-PD-1 monoclonal antibody targeting immune evasion, and standard chemotherapy for patients with the squamous and non-squamous subtypes of non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*, 2018. 10(9): p. 5178-5183.

62. Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumorexpress high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114(8), 1537–1544.

63. Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Honjo, T. (2000).Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027–1034.

64. Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*, 236(1), 219–242

65. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141-51.[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80089-8](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8)

66. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682-7. <https://doi.org/10.1038/nature04444>
67. Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *British Journal of Haematology*. 2013;162(3):313-25. <https://doi.org/10.1111/bjh.12380>
68. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
69. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*. 2001;2(3):261-8. <https://doi.org/10.1038/85330>
70. Hammers H, Plimack E, Infante J, et al. Phase I study of nivolumab in combination with ipilimumab (ipi) in metastatic renal cell carcinoma (mrcc). *Bju International*. 2014;114:8.
71. Sunshine J, Taube JM. Pd-1/Pd-L1 inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*. 2015;23:32-8. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011>
72. Sheppard, K.-A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., ... Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Letters*, 574(1-3), 37–
73. Emel Bülbül Başkan ,T Hücre İmmunitesi, *Türkderm -Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi,Türkderm* 2013; 47: Özel Sayı 1: 18-23,DOI: 10.4274/turkderm.47.s3
74. Rodriguez PC, Popa X, Martínez O, et al. A Phase III Clinical Trial of the Epidermal Growth Factor Vaccine CIMAvax-EGF as Switch Maintenance Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 3782-90.
75. Lonberg N, Korman AJ. Masterful antibodies: checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* 2017; 5: 275-81.
76. Christian Rolfo, Christian Caglevic, Mariacarmela Santarpia, Antonio Araujo; Chapter 5 Immunotherapy in NSCLC: A Promising and Revolutionary Weapon, Springer International Publishing AG 2017 97, A. Naing, J. Hajjar (eds.), Immunotherapy, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 995, DOI 10.1007/978-3-319-53156-4_5

77. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123-35.
78. Herbst RS, Baas P, Kim D-W, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387: 1540-50.
79. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. OAK Study Group. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): A phase 3, openlabel, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2017;389: 255-65.
80. Savabkar, S., et al., Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with gastric cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2013. 6(4): p. 178-82.
81. Coussens, L.M., L. Zitvogel, and A.K. Palucka, Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*, 2013. 339(6117): p. 286-91.
82. Tesniere, A., et al., Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol*, 2008. 20(5): p. 504-11.
83. Pardoll, D.M., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(4): p. 252-64.
84. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 2011. 331(6024): p. 1565-70.
85. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 137-48.
86. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 329-60.
87. Topalian, S.L., G.J. Weiner, and D.M. Pardoll, Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol*, 2011. 29(36): p. 4828-36.
88. Nirschl, C.J. and C.G. Drake, Molecular pathways: coexpression of immune checkpoint molecules: signaling pathways and implications for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(18): p. 4917-24.
89. Kim, E.S., et al., Immune Checkpoint Modulators: An Emerging Antiglioma Armamentarium. *J Immunol Res*, 2016. 2016: p. 4683607.

90. Zeng, J., et al., Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013. 86(2): p.343-9.
91. Iwai, Y., et al., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(19): p. 12293-7.
92. S. Sasaki et al., EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions, *The International Gastric Cancer Association and The Japanese Gastric Cancer Association 2018*, <https://doi.org/10.1007/s10120-018-0880-4>
93. Deng, N., et al., Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 2017. 8(66): p. 110635-110649.
94. Devilee, P. and M.A. Rookus, A tiny step closer to personalized risk prediction for breast cancer. *N Engl J Med*, 2010. 362(11): p. 1043-5.
95. Landau, D.A., et al., Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 2015. 526(7574): p. 525-30.
96. Oldridge, D.A., et al., Genetic predisposition to neuroblastoma mediated by a LMO1 super-enhancer polymorphism. *Nature*, 2015. 528(7582): p. 418-21.
97. Kong, E.K., et al., A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum*, 2005. 52(4): p. 1058-62.
98. Flores, S., et al., [Programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphisms and type 1 diabetes in Chilean children]. *Rev Med Chil*, 2010. 138(5): p. 543-50.
99. Lee, S.H., et al., Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8(6): p. R163.
100. Lin, S.C., et al., Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(3): p. 770-5.
101. Mojtahedi, Z., et al., Programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with colon cancer. *Gene*, 2012. 508(2): p. 229-32.
102. Hua, Z., et al., PD-1 polymorphisms are associated with sporadic breast cancer in Chinese Han population of Northeast China. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. 129(1): p. 195-201.

103. Namavar Jahromi, F., et al., Association of PD-1.5 C/T, but Not PD-1.3 G/A, with Malignant and Benign Brain Tumors in Iranian Patients. *Immunol Invest*, 2017. 46(5): p. 469-480.
104. Yin, L., et al., The programmed death-1 gene polymorphism (PD-1.5 C/T) is associated with non-small cell lung cancer risk in a Chinese Han population. *Int J Clin Exp Med*, 2014. 7(12): p. 5832-6.
105. Yosra Lamami et al; Preliminary report: one of the PD-1 gene variants may be a valuable marker for colorectal cancer; *Arch Med Sci Civil Dis* 2018; 3: e34–e40, DOI: <https://doi.org/10.5114/amscd.2018.75533>
106. Ma, Y., et al., Polymorphisms of co-inhibitory molecules (CTLA-4/PD-1/PD-L1) and the risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population. *Int J Clin Exp Med*, 2015. 8(9): p. 16585-91.
107. Chen, Y.B., et al., Association between single nucleotide polymorphism of PD-L1 gene and non-small cell lung cancer susceptibility in a Chinese population. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2014. 10(2): p. e1-6.
108. Cheng, S., et al., PD-L1 gene polymorphism and high level of plasma soluble PD-L1 protein may be associated with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers*, 2015. 30(4): p. e364-8.
109. Lee, S.Y., et al., Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene*, 2017. 599: p. 28-35.
110. Hashemi, M., et al., Association between PD-1 and PD-L1 Polymorphisms and the Risk of Cancer: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Cancers (Basel)*, 2019. 11(8).
111. Cheng, H.Y., et al., Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2014. 9(11): p. e95870.
112. Sorensen, S.F., et al., Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*, 2016. 100: p. 77-84.
113. Zhang, P., et al., [Levels of programmed death-1 and programmed death ligand-1 in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical implications]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2015. 33(5): p. 529-33.
114. Monso, E., et al., Biological Marker Analysis as Part of the CIBERES-RTIC Cancer-SEPAR Strategic Project on Lung Cancer. *Arch Bronconeumol*, 2015. 51(9): p. 462-7.

115. Lafuente-Sanchis, A., et al., Association of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 Gene Expression and Clinicopathologic Characteristics in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*, 2017. 18(2): p. e109-e116.
116. Dr. Özlem Durak, *Invaziv Meme Karsinomlarında Immünohistokimyasal Pd1, Pdl1 Ve Pdl2 Ekspresyonlarının Araştırılması (Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2018-Isparta)*
117. Lou, J., et al., Relationship Between PD-L1 Expression and Clinical Characteristics in Patients with Breast Invasive Ductal Carcinoma. *Open Med (Wars)*, 2017. 12: p. 288-292.
118. Baptista, M.Z., et al., Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol*, 2016. 47(1): p. 78-84.
119. Sabatier, R., et al., Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(7): p. 5449-64.
120. Muenst, S., et al., Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. 146(1): p.15-24.

FORMLAR

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Çalışmanın Adı: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde PD1 PDL1 Sinyal Yolu ile İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi

Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma bir araştırmadır. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla ve nasıl yapılacağını anlamanız ve katılıp katılmama doğrultusundaki kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma hakkında sözlü olarak size aktaracağım bilgiler yazılı olarak da size bir sonraki bölümde sunulacaktır. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu belgedeki son bölüm onay işlemleri ile ilgilidir. Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz lütfen bu bölümü imzalayınız. Okuma ve yazma konusunda engelleriniz olduğu takdirde bir tanığın gözetiminde bu belgeyi onaylamanız istenecek ve gerektiğinde parmak iziniz alınacaktır.

Araştırmanın amacı, hastalığınızın gelişimi üzerine etkisi olduğu düşünülen genlerdeki değişiklikleri tespit etmektir. Araştırmaya katılacak tahmini gönüllü sayısı 200'dür. Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

Sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacak bu çalışma, kısa dönemde size bir fayda da sağlamayacaktır. Ancak uzun dönemde hastalığın gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmek için çalışma önemlidir.

Bu çalışma için sizden alınan kan kullanılacaktır. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Bu gibi durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır. Alınacak olan bu kan laboratuvarımızda çalışılacaktır.

Ayrıca bu çalışma için sizden ameliyatınız sırasında cerrahınız tarafından alınacak olan dokudan 1 cm³ parça kullanılacaktır. Alınacak olan bu doku laboratuvarımızda çalışılacaktır.

Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilir ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız, gebe kalmanız veya bir yan etkiye maruz kalmanız vb. nedenlerle doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

Siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Ayrıca kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır. Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiye 7/24 saat **0506 929 54 90** numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

Hasta Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bu klinik araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

“Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde PD1 PDL1 Sinyal Yolu ile İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi ” araştırması kapsamında alınan kan örneklerinin;

- ☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

	Gönüllünün	İmzası
Adı Soyadı		
Adresi		
Telefonve Faks		
Tarih		

Velayet Veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin Veli Veya Vasinin		İmzası
Adı Soyadı		
Adresi		
Telefon Ve Faks		
Tarih		

Açıklamaları Yapan Araştırmacının		İmzası
Adı Soyadı		
Tarih		

Rıza Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin		İmzası
Adı Soyadı		
Görevi		
Tarih		

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 49

Konu: Prof. Dr. İlhan YAYLIM hk.

Tarih : 16.01.2018

Sayın Prof. Dr. İlhan YAYLIM
Moleküler Tıp

İlgi: Moleküler Tıp Anabilim Dalının 05/01/2018 gün ve 6587 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Msc. Şeyda ERCAN' ın yürüteceği 2018/18 dosya numaralı "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde PD1 PDL1 Sinyal Yolu ile ilişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/01/2018 tarih ve 01 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri PDL1 PDL1 Sinyal Yolu İle İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05/01/2018		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01	Tarih: 12/01/2018		
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. İlhan YAYLIM' ın sorumluluğunda ve Msc. Şeyda ERCAN' ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU							
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN				
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *	Katılım **	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	İmza
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* -Araştırma ile ilişki

** -Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri PDL1 PDL1 Sinyal Yolu İle İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05/01/2018		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01	Tarih: 12/01/2018		
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. İlhan YAYLIM' ın sorumluluğunda ve Msc. Şeyda ERCAN' ın yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *	Katılım **		İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* -Araştırma ile ilişki
 ** -Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde PD1 PDL1 Sinyal Yolu İle İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İlhan YAYLIM			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Tıp			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde PD1 PDL1 Sinyal Yolu İle İlişkili Kritik Gen Varyantları ve İlgili Gen Anlatımlarının İncelenmesi"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. İlhan YAYLIM			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Tıp			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1			☐
	FAZ 2			☐
	FAZ 3			☐
	FAZ 4			☐
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon			☐
	Yüksek Doz Araştırması			☐
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE PD1 PDL1 SİNYAL YOLU İLE İLİŞKİLİ KRİTİK GEN VARYANTLARI VE İLGİLİ GEN ANLATIMLARININ İNCELENMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 17	% 7	% 2	% 15
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 10
2	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
4	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	issuu.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	www.turkjbiochem.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şeyda	Soyadı	DEMİRKOL
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	01/08/1982
Email	seyda.erc@gmail.com	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı	-
Yük.Lis.	T.C İstanbul Bilim Üniversitesi	2015
Lisans	Gaziantep Üniversitesi	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ	2018
2.	Öğretim Görevlisi	İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ	2016-2017
3.	Öğretim Görevlisi	T.C İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ	2012-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	YDS	72

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI,SSCI,AHCI INDEXLERİNE GİREN DERGİLERDE YAYIMLANAN

MAKALELER

1. Yosra Lamami, Roya Mesediyeva, Soykan Arıkan, Şeyda Ercan, Hilal Fındık Kıyan, Cihat Tatar, Ali Emre Naycı, Ammad Farooqi, İlhan Yaylım, Bayram Kıran., "Preliminary report: One of the PD-1 gene variants may be a valuable marker for colorectal cancer", Archives Of Medical Science, vol.3, pp.34-40, 2018.
2. Öncü Koç Erbaşoğlu, Cem Horozoğlu, Şeyda Ercan, Hasan Volkan Kara, Akif Turna, Ammad Ahmad Farooqi & İlhan Yaylım "Effect of trail C1595T variant and gene expression on the pathogenesis of non-small cell lung cancer", Libyan Journal of Medicine, 14:1, 1535746, DOI: 10.1080/19932820. 2018. 1535746, 2018
3. Turna Akif, Horozoğlu Cem, Erbaşoğlu Koç Öncü, Ercan Şeyda, Küçükhüseyin Özlem, Turan Saime, Hakan Mehmet Tolgahan, Kara Hasan Volkan, Hekimoğlu Elvin, Zeybek Şakir Ümit, Coşkunpınar Ender, Ergen Hayriye Arzu, Yaylım İlhan "The Importance of PDL-1 Gene Expression, EGFR Gene Mutations and EGFR Serum Levels in Turkish Non-Small Cell Lung Cancer Patients". Turkish journal of thoracic and cardiovascular surgery (Yayın No: 4206908) (2018).

DİĞER DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Ezgi Nurdan Yenilmez, Seyda Ercan, Güldal Inal Gültekin, Levent Verim, Saime Turan, Ozlem Küçükhüseyin, Gurbet Korkmaz, Canan Cacına, Hilal Fındık, Özge Özgen, İlhan Yaylım. "A Preliminary Report On p16 540 C > G, p16 580 C>T and MDM2 SNP309 Gene Variants in Bladder Cancer". Global Journal of Pathology and Microbiology, 2017,5,1-7.

HAKEMLİ KONGRE/SEMPOZYUM BİLDİRİ

KİTAPLARINDA YER ALAN YAYINLAR

1. Sönmez D., Ercan Ş., Arıkan S., Hakan M.T., Meshediyeva R., Küçükhüseyin Ö., Yaylım İ. "CD40 Gene Variant May Be A Possible Risk Factor For Colorectal Cancer" 2th International Congress on Oncological Sciences, Antalya, Turkey, 20-23 September 2018
2. Sönmez D., Ercan Ş., Arıkan S., Lamami Y., Hakan M.T., Küçükhüseyin Ö., et al., "The Importance of PDL1-PD1 Genetic Variants in The Risk of Colorectal Cancer", 2th Global Cancer Meet 2018, Rome, ITALY, 27-28 Ağustos 2018, pp.20-20
3. Hakan, Ayşegül Verim, İlhan Yaylım, " Investigation Of Pd-1 Gene Polymorphism (Pd-1.5 C/T) In Turkish Patients With Laryngeal Cancer" XV. National Medical Biology and Genetics Congress, 26 - 29 October 2017, Muğla, TURKEY.

4. Bayram Kıran, Şeyda Ercan, Soykan Arıkan, Dilara Sönmez, Ebru Nur Ay, Yosra Lamami, Hilal Fındık, Mehmet Tolgahan Hakan, Yemliha Yıldız, İlhan Yaylın, "Investigation Of PD-1 Gene Polymorphism (PD-1.5 C/T) In Turkish Patients With Gastric Cancer", International Congress of Biochemistry , 2017/28 National Biochemistry Congress Erzurum, TURKEY.
5. Öncü Koç Erbaşoğlu, Cem Horozoğlu, Şeyda Ercan, Hasan Volkan Kara, Akif Turna, İlhan yaylın, " Trail Is Associated With Tumor Progression On Non-Small Cell Lung Cancer", VI. International Congress of Molecular Medicine- (Özet Bildiri/Poster), 22-25 May 2017 Istanbul, TURKEY.
6. Akif Turna,Cem Horozoğlu, Şeyda Ercan, Ö ncü Koç Erbaşoğlu, Saime Turan, Mehmet Tolgahan Hakan, Ozlem Küçükhüseyin,Hasan Volkan Kara, Ümit Zeybek, İlhan Yaylın, "The PD-L1 Gene Expression Levels And Histopathological Characteristics Of Non-Small Lung Carcinomas With Egfr Gene Mutations",VI. International Congress of Molecular Medicine ,22-25 May 2017 Istanbul, TURKEY.
7. Şeyda Ercan, Roya Mesediyeva, Faruk Çelik, Dilara Sönmez, Selin Baltacı, Bilsay Metin Ekiz, Aysegul Verim, Gulbu Isitmangil, Ümit Zeybek, İlhan Yaylın, "Is There Any Relationship Between The Icam-1 +469 A/G Polymorphism And Larynx Cancer in a Turkish Population", 6th Molecular Medicine Congress, 22-25 May 2017, ISTANBUL, TURKEY.
8. Gizem Yaman, Şeyda Ercan, "Investigation Apoptotic And Inflammatory Responses in Hep3b Hepatoma Cell Of Cynarin And Inuline Polyfenols in Artichoke Plants", II. Life Sciences Congress, 23-25 February 2017- Kayseri, TURKEY.
9. Şeyda Ercan, Gizem Yaman, Veysel Sabri Haçer, Mehmet Gültekin Ercan, "Analysis of Mrp-1 And Mrp-2 Gen Expressions in Dilate Cardiomyopathy Diseases, II. Life Sciences Congress, 23-25 February 2017- Kayseri, TURKEY.
10. Cem Horozoğlu, Şeyda Ercan, Öncü Koç Erbaşoğlu, Soykan Arıkan, Canan Kelten Talu, Özlem Küçükhüseyin, İlhan Yaylın " Uzun Zincirli Yağ Asidi Metabolizması Yönünden Bir Örnek Olarak FABP-1 Gen Anlatım Düzeylerinin Bazı Kolorektal Kanserli Olgularda Histopatolojik Parametrelere Göre Değerlendirilmesi" X. Aziz Sancar DETAE Günleri, 29-30 Kasım 2018, ISTANBUL, TURKEY.
11. Dilara Sönmez, Şeyda Ercan, Ebru Nur Ay, Soykan Arıkan, Mehmet Tolgahan Hakan, Özlem Küçükhüseyin, Cem Horozoğlu, Yemliha Yıldız, Cihat Tatar, Bayram Kıran, İlhan Yaylın. Pd -1/Pd-L1 Genetic Variants And Soluble Pd-1 Levels in Gastric Cancer. 7. Multidisipliner Kanser Araştırma & 1. Temel Onkoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 11-14 Ekim 2018, İzmir, TÜRKİYE.
12. Horozoğlu Cem,Yildiz Yemliha, Ercan Şeyda, Mashadiyeva Roya, Demirbağ Sinem,Baltacı Selin,Koç Erbaşoğlu Öncü,Soykan Arıkan,Zeybek Şakir Ümit,Yaylın İlhan. Mide Karsinomalı Vakalarda Trail C1595t (Rs1131580) Gen Varyantının Klinik Ve Histopatolojik Açidan İncelenmesi. VIII. ASDETA E Günleri, (2016). (Yayın No:3519980)
13. Cem Horozoglu, Dilara Sönmez ,Şeyda Ercan, Soykan Arıkan, Canan Kelten Talu, Mehmet Tolgahan Hakan, Özlem Küçükhüseyin, İlhan Yaylın "Bir İlk Ön Rapor: Mide Kanserli Hastalarda İnflamatuar Biyomarker Olarak Çözünebilir GİTR,

OX40L ve CD40L'nin Potansiyel Rolü”, ISMS 5th International Symposium on Multidisciplinary Studies, 16-17 November 2018, Ankara, Turkey.

14. Ercan Şeyda , Horozoğlu Cem, Verim Ayşegül, Sönmez Dilara, Küçük Hüseyin Özlem, Hakan Mehmet Tolgahan, et al., "An Example For Clinical Data Usage In Polymorphism Studies. Galectin-3 And Icam-1 Gene Variations In Laryngeal Cancer", Investigator-Initiated Clinical Research and Data Symposium, İSTANBUL, TÜRKİYE, 12-13 Eylül 2018, ss.9-9
15. Ercan Şeyda, Sönmez Dilara, Rajab Basem, Verim Ayşegül, Tolgahan Hakan M. ,Kıran Bayram, İlhan Yaylın; “A Possible Prognostic Significance of TIM1 Gene Variant In Laryngeal Cancer” 7th Annual Meeting of the Middle-Eastern Association for Cancer Research, 21-22 December 2017, Gaziantep, Turkey.

