

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DİŞİ AKCİĞER
KARSİNOMLARINDA MAKROFAJ
AKTİVASYONUNDA ETKİLİ FOLLISTATIN-LIKE
PROTEİN 1, HIGH MOBILITY GROUP BOX1,
OSTEOPONTIN PROTEİNLERİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuğba KARAMAN MERCAN

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER
KARSİNOMLARINDA MAKROFAJ
AKTİVASYONUNDA ETKİLİ FOLLISTATIN-LIKE
PROTEIN 1, HIGH MOBILITY GROUP BOX1,
OSTEOPONTIN PROTEİNLERİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuğba KARAMAN MERCAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

Bu tez, TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projeleri kapsamında 123S107 proje numarası ve aynı zamanda Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-5563 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. İrem Hicran ÖZBUDAK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Sezin YAKUT UZUNER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Canan SADULLAHOĞLU
S.B.Ü Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilay ÇAVUŞOĞLU YALÇIN
S.B.Ü Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK 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 beyan ederim.

Öğrenci

Arş.Gör.Dr.Tuğba KARAMAN MERCAN

İmza

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim ve öğretim sürecinde kıymetli akademik bilgilerini öğreten, her zaman yol gösterici olan, ve özverisini eksik etmeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e

Tezimin değerlendirilmesinde katkıları olan değerli jüri üyeleri Prof. Dr. İrem Hicran ÖZBUDAK, Doç. Dr. Sezin Yakut UZUNER, Doç. Dr. Canan SADULLAHOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Nilay ÇAVUŞOĞLU YALÇIN'a

Doktora tez projem boyunca akademik destek veren, adeta kendi öğrencisi gibi gören ve hissettiren, ileri görüşlülüğüyle projemin ilerlemesine yol gösterici olan, laboratuvarını ve imkanlarını sunan, kendisiyle çalışmaktan gurur duyduğum kıymetli hocam Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Saffet ÖZTÜRK'e, immünohistokimya deneylerinde yardımcı olan, bilgi ve tecrübeleri aktaran doktora öğrencisi Günel TALİBOVA'ya ve cihazları kullanmam için izin veren Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU'ya,

Tez çalışmam için numuneler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi'nden toplanmıştır. İki kurumda klinik bilgilere ulaşılmasında yardımcı olan, emeği geçen Göğüs Cerrahisi ve Patoloji Anabilim dalı asistanlarına ve tüm personeline, çalışmaya klinik uzmanlığıyla yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Abdullah ERDOĞAN'a,

Deney aşamasında deneyimlerimden faydalandığım, başarabileceğime inancımı hep hissettiren, bilgisini aktaran hem kıdemlim hem can dostum Dr. Gökçe ERDOĞAN'a,

Doktora eğitimimde bilgi ve deneyimlerimden faydalandığım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine, yardımları ile her zaman yanımda olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün çalışanlarına,

Akademik alanda çalışmamalarına rağmen beni anlamaya çalışan, motive eden dostlarım Gamze TROŞALA ve Merve ERDOĞAN'a maddi manevi yanımda her zaman olan, gösterdiği fedakarlıklarla okumam için çabalayan beni güçlü bir kadın olarak yetiştiren annem Mümine KARAMAN'a ve hayallerimin peşinden gitmem için hep yanımda duran abim Oğuzhan KARAMAN'a , başarılarımın temelini atan ve hayatımda varlığıyla en büyük destekçilerimden biri olan değerli ilkokul öğretmenim Fatma ÖZTEPE'ye

Bana her daim destek sevgili eşim Tanju MERCAN'a, beni anneleri olarak seçen kıymetli oğullarım Rüzgar ve Artun'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) tümör mikroçevresinde (TME) makrofaj polarizasyonunda rol oynayan endojen proteinlerin etkilerini incelemek amacıyla Follistatin-like Protein 1(FSTL1), High Mobility Group Box1(HMGB1) ve Osteopontin (OPN) proteinlerinin ekspresyonu ve ilişkili makrofaj polarizasyonu belirteçleri araştırılmıştır. Bu çalışmada bu proteinlerin tümör mikroçevresindeki rollerinin ve makrofaj polarizasyonuna olan etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: KHDAK (n=15) hastalarından cerrahi olarak çıkarılmış tümör dokularında *FSTL1*, *HMGB1* ve *OPN* mRNA seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ile ölçülmüştür. Tümör ve tümöre komşu normal dokularda hedef proteinlerin ve makrofaj polarizasyon belirteçlerinin immünohistokimya (IHC) ile ekspresyonları incelenmiştir. Serum örneklerinde ise hedef proteinlerin konsantrasyonları ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Bulgular: Tümör dokusundaki FSTL1 ve HMGB1 protein ekspresyonları arasında anlamlı bir pozitif korelasyon bulunmuştur ($p=0.017$). Ayrıca, tümör dokusunda M2 makrofaj belirteci olarak bilinen CD206 protein ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında pozitif ilişki saptanmıştır ($p=0.033$). Tümör dokusunda *FSTL1* ve *OPN* genlerinin mRNA ekspresyonu arasında negatif korelasyon gözlenmiştir ($p=0.035$). Tümör dokuda *HMGB1* geninin mRNA ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($p=0.002$).

Sonuç: Elde edilen bulgular, FSTL1, HMGB1 ve OPN proteinlerinin KHDAK'da TME makrofaj polarizasyonu ve tümör büyüklüğü gibi önemli roller oynadığını göstermektedir. HMGB1 ve CD206'nın tümör büyüklüğünün değerlendirilmesinde ve tedavide hedefi olarak incelenmesini desteklemektedir. Gelecek çalışmalar, bu proteinlerin TME'deki sinerjik etkilerini ve mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak araştırarak klinik uygulamalar için yeni stratejiler geliştirebilir.

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, FSTL1, HMGB1, OPN, makrofaj polarizasyonu

ABSTRACT

Objective: This study aimed to investigate the effects of endogenous proteins Follistatin-like Protein 1 (FSTL1), High Mobility Group Box1 (HMGB1), and Osteopontin (OPN) on macrophage polarization within the tumor microenvironment (TME) of non-small cell lung cancer (NSCLC). The role of these proteins in the TME and their influence on macrophage polarization markers were evaluated.

Method: Tumor tissues and adjacent normal tissues were surgically collected from 15 patients diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC). The mRNA levels of Follistatin-like Protein 1 (FSTL1), High Mobility Group Box1 (HMGB1), and Osteopontin (OPN) were quantified using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression of target proteins and macrophage polarization markers in tumor and adjacent normal tissues was assessed through immunohistochemistry (IHC). Additionally, the concentrations of these proteins in serum samples were quantified using ELISA.

Results: A significant positive correlation was found between the protein expressions of FSTL1 and HMGB1 in tumor tissue ($p=0.017$). Furthermore, a positive relationship was observed between the expression of the M2 macrophage marker CD206 and tumor size ($p=0.033$). A negative correlation was noted between the mRNA expressions of *FSTL1* and *OPN* ($p=0.035$). Additionally, a significant correlation was identified between the mRNA expression of *HMGB1* and tumor size ($p=0.002$).

Conclusion: The findings suggest that FSTL1, HMGB1, and OPN play significant roles in macrophage polarization and tumor size in NSCLC. The involvement of HMGB1 and CD206 in evaluating tumor size and as potential therapeutic targets is supported. Future studies should explore the synergistic effects and mechanisms of these proteins in the TME to develop new clinical strategies.

Key words: Non-small cell lung carcinoma, FSTL1, HMGB1, OPN, macrophage polarization

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.2. Akciğer Kanseri Evreleme	3
2.3. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması	6
2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflandırılması	7
2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflandırılması	8
2.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Teşhis ve Moleküler Testleri	10
2.5. Akciğer Tümör Mikroçevresi	13
2.5.1. Makrofajlar	14
2.6. Follistatin-Like Protein 1	23
2.7. Osteopontin	25
2.8. High Mobility Group Box1	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Hasta Seçimi ve Numunelerin Toplanması	33
3.2. İmmünohistokimya Yöntemi	34
3.3. RNA İzolasyonu	36
3.4. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi	37

3.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	38
3.6. İnsan FSTL1 Protein Ekspresyonun ELISA Yöntemiyle Tayini	39
3.7. İnsan HMGB1 Protein Ekspresyonun ELISA Yöntemiyle Tayini	40
3.8. İnsan OPN Protein Ekspresyonun ELISA Yöntemiyle Tayini	40
4. BULGULAR	42
4.1. Hastaların Demografik, Klinik ve Patolojik Bulguları	42
4.2. İmmünohistokimya Deneylerinin Analiz Sonuçları	43
4.3. qRT-PCR Deneyin Analizi Sonuçları	48
4.4. ELISA Deneyinin Analiz Sonuçları	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	77

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Malign tümör sınıflandırmasının TNM evreleme sistemi	4
Tablo 2.2. Tümörle ilişkili makrofajlar ve akciğer kanseri prognozu	19
Tablo 2.3. Tümör hücre hatlarında FSTL1'in ekspresyon artışının ya da azalışının sağlanmasının hücre proliferasyonu, metastazı, apoptozu üzerindeki etkilerinin sonuçları	25
Tablo 4.1. Hastalara ait demografik, klinik ve patolojik bulgular	43



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1** Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması (Şekil, Biorender web sitesinde tasarlanmıştır.) 6
- Şekil 2.2.** Tümör mikroçevresi (Biorender.com kullanılarak hazırlandı.) 13
- Şekil 2.3.** Akciğer makrofajlarının M1 veya M2 polarizasyonu. IFN- γ , interferon gamma; LPS, lipopolisakkarit; TNF- α , tümör nekrozis faktör-alfa; MHC, doku uyumluluk kompleksi; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; IL, interlökin; TGF- β , doku büyüme faktörü-beta; VEGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü (Li Z. ve ark., 2022) makalesinden modifiye edilmiştir. 15
- Şekil 2.4** Makrofajların KHDAK'nin kanser odağında ve kanser stromasındaki dağılımı (Li Z. ve ark., 2018). KHDAK'nin makrofajlar için CD68 veya CD204 antikorları ile immüno boyanması. A. Kanser odağında yüksek sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. B. Kanser odağında düşük sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. C. Kanser odağında yüksek sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar. D. Kanser odağında düşük sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar. E. Kanser stromasında yüksek sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. F. Kanser stromasında düşük sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. G. Kanser stromasında yüksek sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar; H. Kanser stromasında düşük sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar. Şekil üzerinde modifiye edilerek kullanılmıştır. 16
- Şekil 2.5.** FSTL1'in tümör büyümesi ve metastazındaki işlevi (Mattiotti vd., 2018). Şekil modifiye edilerek kullanılmıştır. 24
- Şekil 2.6.** Kanser hücresinde osteopontin rolü ve mekanizmalar (Bastos ve ark., 2023) makalesinden pixlr.com kullanılarak modifiye edilmiştir. 27
- Şekil 2.7.** HMGB1, hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve metastazını düzenler. (Şekil, Biorender web sitesinde tasarlanmıştır.) 31
- Şekil 4.1.** IHC yapılan tümöre komşu ve tümör dokularında FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7, CD206 proteinlerin ekspresyonu ile negatif kontrol örneklerinin 200X ve 400X büyütmede çekilen mikroyrafları 44
- Şekil 4.2.** Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında FSTL1 protein ekspresyonu 45

Şekil 4.3. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre Tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında HMGB1 protein ekspresyonu	45
Şekil 4.4. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında OPN protein ekspresyonu	45
Şekil 4.5. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında CCR7 protein ekspresyonu	46
Şekil 4.6. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında CD206 protein ekspresyonu	46
Şekil 4.7. Tümöre komşu normal dokuda ve tümör dokuda FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 proteinlerin total göreceli ekspresyonları. Elde edilen veriler, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. *(p<0.05) ve **(p<0.01) işaretleri olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. “ns” yazılı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır (p<0.05). “N” tümöre komşu normal doku, “T” tümör doku kısaltması olarak verilmiştir.	47
Şekil 4.8. CD206 protein ekspresyon seviyesinin, tümör büyüklüğü ≤ 4 cm ve >4 cm olan gruplarda gösterilmiştir.	48
Şekil 4.9. Tümöre komşu normal doku ve tümör dokuda <i>FSTL1</i> , <i>HMGB1</i> ve <i>OPN</i> genlerinin mRNA’ların göreceli ekspresyonları. Elde edilen veriler, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. * (p<0.05) ve **(p<0.01) işaretli olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. “ns” yazılı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. “N” Tümöre komşu normal doku, “T” tümör doku kısaltması olarak verilmiştir.	49
Şekil 4.10. Tümör dokusunda <i>HMGB1</i> geninin mRNA ekspresyon seviyesi, tümör büyüklüğü ≤ 4 cm ve >4 cm olan gruplarda gösterilmiştir.	49
Şekil 4.11. FSTL1(a), HMGB1(b) ve OPN(c) proteinlerinin ELISA deney sonucunda excelde oluşturulan denklemleri	50
Şekil 4.12. Hastaların operasyon öncesi ve sonrası serumlarında FSTL1 proteini(a), HMGB1 proteini(b), OPN proteini(c) konsantrasyon seviyeleri. Elde edilen veriler, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Operasyon öncesi ve sonrası serumlarda FSTL1, HMGB1 ve OPN protein konsantrasyonları arasında fark belirlenmemiştir (p>0.05).	51

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADC	: Adenokarsinom
AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
Akt	: Protein Kinaz B
ALK	: Anaplastik Lenfoma kinaz
BMP	: Kemik Morfogenetik Proteini
CCL2	: C-C Motif Kemokin Ligandı 2
CCR2	: C-C Motif Kemokin Reseptör 2
CCR7	: C-C Motif Kemokin Reseptörü 7
CD206	: Mannoze Reseptörü C-Tip 1
CD56	: Nöral Hücre Adezyon Molekülü
cDNA	: Komplementer DNA
CSF-1	: Koloni Uyarıcı Faktör 1
CXCL12	: C-X-C Motif Kemokin Ligandı 12
CXCR4	: C-X-C Motif Kemokin Reseptör 4
DAB	: 3, 3'-diaminobenzidine
DAMP	: Hasar İlişkili Moleküler Paternler
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi
EML4-ALK	: Ekinoderm Mikrotübülü ile İlişkili Protein Benzeri 4-ALK
EMT	: Epitelyal- Mezenkimal geçişi
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit sentaz
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. Food and Drug Administration)
FSTL1	: Follistatin Like Protein 1
g	: Yerçekimi
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz-3 Beta
HCL	: Hidroklorik Asit
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HMGB1	: High Mobility Grup Box-1
HRP	: Streptavidin Peroksidaz
IFN-γ	: İnterferon gama
IHC	: İmmünohistokimya
IL	: İnterlökin
INSM1	: İnsülinoma İlişkili Protein 1
IRF7	: İnterferon Regülatör Faktör 7

iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
iOPN	: İntraselüler Osteopontin
JAK2	: Janus Kinaz 2
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
Ki-67	: Kiel 67
KRAS	: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue
L	: Lösin
LCLC	: Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu
LLC	: Lewis Akciğer karsinom
LPS	: Lipopolisakkarit
M	: Metastaz
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinazlar
Met	: Mezenkimal-Epitel Geçiş Faktörü
MHC	: Doku Uyumluluk Kompleksi
Min	: minimal
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı RNA
MyD88	: İnsan Myeloid Farklılaşma Birincil Yanıt Geni 88
N	: Lenf Nodu Tutulumu

NF-kB	: Nukleer Faktör kappa B
ng	: Nanogram
NK	: Doğal öldürücü Hücreler
NO	: Nitrik Oksit
Oct-4	: Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4
OPN	: Osteopontin
P2X7	: P2X Purinoseptör 7
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD-1	: Programlı Hücre Ölümü-I
PD-L1	: Programlı Hücre Ölümü Ligand-1
PFS	: Progresyonsuz Ortalama Sağkalım
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
Plk-1	: Polo-benzeri Kinaz-1
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	: Arjinin
RAGE	: Gelişmiş glikasyon Son Ürünleri Reseptörü
RNA	: Ribonükleik Asid
ROCK	: Rho-İlişkili, Sarmal-Sarmal İçeren Protein Kinaz 1
siRNA	: Küçük İnterferans RNA

sOPN	: Salgılanan Osteopontin
SP	: Sinyal Peptid
SqCC	: Skuamöz Hücreli Karsinom
STAT3	: Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
T	: Tümör
TAM	: Tümörle İlişkili Makrofajlar
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörleri
TLR9	: Toll-like Reseptörler
TME	: Tümör Mikroçevresi
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
TTF-1	: Tiroid Transkripsiyon Faktör-1
Tyr	: Tirozin
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Wnt	: Wingless(kanatsız)/int1
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar

1. GİRİŞ

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), akciğer kanserinin en yaygın ve agresif formlarından biridir ve tümör mikroçevresi, hastalığın gelişiminde ve seyrinde kritik bir rol oynamaktadır (Belli ve ark., 2018; Hinshaw ve Shevde, 2019). Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin yanı sıra, bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, kan damarları ve ekstraselüler matris gibi bileşenlerden oluşur (Wu T. ve Dai, 2017). Bu mikroçevre, tümör hücrelerinin büyümesini, metastaz yapmasını ve tedavilere direnç geliştirmesini etkileyen karmaşık etkileşimler sunar (Wang L. ve ark., 2023). Özellikle makrofajlar, tümör mikroçevresinde önemli bir yer tutar; M2 polarize makrofajlar, tümör büyümesini destekleyici ve bağışıklık yanıtını baskılayıcı etkileriyle bilinirken, M1 makrofajlar tümör karşıtı özellikler sergiler (Pan ve ark., 2020; Wu K. ve ark., 2020). KHDAK'da, tümör mikroçevresinin bileşenleri arasındaki denge, hastalığın prognozu ve tedaviye yanıt üzerinde belirleyici bir etki yaratabilir. Bu nedenle, tümör mikroçevresinin derinlemesine incelenmesinin, yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşıdığı görülmektedir.

Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında tümör mikroçevresinde makrofaj polarizasyonunda rol alan proteinler hakkında bilgiler kısıtlıdır. Follistatin like-1 (FSTL1), High Mobility Grup Box-1 (HMGB1) ve Osteopontin (OPN) proteinleri tek tek incelendiğinde bunların makrofaj polarizasyonunda ve tümör mikroçevresindeki sitokin içeriğinin düzenlenmesinde rol oynadığı kısmen bilinmektedir.

FSTL1 eksikliğinde, M2 polarizasyonunu teşvik etme yeteneği ile dikkat çekmektedir (Ahmed ve ark., 2011). IL-4 ve IL-13 gibi M2 polarize edici sitokinlerle etkileşime girerek, makrofajların anti-inflamatuar gen ekspresyonunu artırır ve pro-inflamatuar yanıtları baskılar (Zhou Q. ve ark., 2017; Yao ve ark., 2018). HMGB1, inflammatuar yanıtların düzenlenmesinde kritik bir faktördür. Hücre dışına salındığında, HMGB1, M1 polarizasyonunu teşvik eden pro-inflamatuar sitokinlerin (örneğin, TNF- α ve IL-6) salgısını artırarak, makrofajların M1 fenotipine yönelmesine katkıda bulunur (Schaper ve ark., 2016). OPN, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde etkili bir molekül olarak öne çıkardığı bilinmektedir. OPN, JAK2/STAT3 sinyal yolu aracılığıyla M2 polarizasyonunu desteklemektedir (Yang X. ve ark., 2024). Bu

özellikler, FSTL1'i inflamasyonun ve aşırı bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kritik bir molekül haline getirirken, kanser mikroçevresinde de tümör ilerlemesini destekleyici etkileri nedeniyle tedavi edici hedef olarak önem kazandırmaktadır.

Ayrıca, HMGB1'in TLR (Toll-like receptor) ile etkileşimi, inflamatuvar süreçlerin güçlenmesine ve bağışıklık yanıtının aktive olmasına neden olur (Shiau ve ark., 2020). Dolayısıyla HMGB1 proteini üzerinde daha net bilgiler edinilebilmesi için ileri çalışmaların olması katkı(lar) sağlayacaktır.

Bu tez projesinde; akciğer kanser biyolojisi açısından önemi bilinmekte olan FSTL1, OPN ve HMGB1 proteinlerinin küçük hücreli dışı akciğer karsinomunda ve çevre dokulardaki ekspresyon seviyelerinin tümöre infiltre makrofajların polarizasyonu ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Evrensel kanser istatistikleri (GLOBOCAN) 2020 yılı verilerine göre, akciğer kanseri dünyada en sık teşhis edilen ikinci kanser tipi olmakla birlikte kanser nedeniyle ölümlerin önde gelen sebebidir. Akciğer kanserinin erkeklerde kanser morbidite ve mortalitesinin önde gelen nedeni olduğu, kadınlara bakıldığında ise insidans açısından meme ve kolorektal kanserlerden sonra üçüncü sırada geldiği ve meme kanserinden sonra mortalite açısından ikinci sırada yer aldığı tespit edilmiştir (Sung ve ark., 2021). Akciğer kanseri tanısı genellikle ileri evreye gelene kadar konulamadığından, akciğer kanseri nedeniyle ölüm oranı yüksektir (Nooreldeen ve Bach, 2021)

Son yıllarda kadınlarda sigara içme ve akciğer kanseri teşhisi oranı, erkeklere göre belirgin bir şekilde artmıştır. Sigara karşıtı kampanyalar, çoğu gelişmiş ülkede erkeklerde akciğer kanseri vakalarının ve buna bağlı ölümlerin azalmasına neden olmuştur. Ancak kadınlarda tam tersine akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi artmaktadır (Zhang Y. ve ark., 2018a; Barta ve ark., 2019; Jani ve ark., 2021).

2.2. Akciğer Kanseri Evreleme

Akciğer kanseri, geniş kapsamlı hem klinik hem de patolojik özelliklere sahip heterojen bir hastalıktır. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), hava yolu submukozasından peri-hiler kökenli merkezi bir tümörden oluşmaktadır. Histolojik araştırmalar, bu kanser türünün bazal bronşiyal epitelyumun nöroendokrin hücrelerinden kaynaklandığını göstermiştir (Kumar ve ark., 2014). Hücreler küçük, iğsi veya yuvarlak hücrelerdir, sitoplazmaları yetersizdir granüler kromatine sahiptir; ayrıca hücrelerin nekroza uğraması oldukça yaygındır (Travis, 2012). KHAK; beyne, karaciğere ve kemiğe metastaz yapabilme (Kumar ve ark., 2014) özelliğinden dolayı sınırlı veya kapsamlı evreler olarak sınıflandırılmıştır (Kalemkerian ve Schneider, 2017). Sınırlı KHAK evresi, tek bir radyasyon noktası, ipsilateral mediasten ve ipsilateral mediastinal veya supraklaviküler lenf düğümleriyle sınırlıdır. Supraklaviküler lenf nodlarında kanser, göğsün aynı tarafında bulunduğu sürece o kategoride değerlendirilir (Nooreldeen ve Bach, 2021). KHDAK türü; histolojik olarak adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinom olarak ayrılır.

Evrelerin adlandırılması Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) (Edge ve Compton, 2010) tarafından formüle edilmiştir ve TNM evreleme sistemi olarak tanımlanmıştır.

TNM sistemi, birincil tümörün boyutunu (T), tümörün lenf düğümlerine yayılmasını (N) ve metastazın varlığını (M) kullanarak kanserin evresini belirlemeye yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, nihai TNM sınıflandırması, T1-T4 olarak kategorize edilen tümör özelliklerinin (T), dahil olan lenf düğümlerinin (N0-N3) ve metastaz varlığının (M1) veya yokluğunun (M0) kombinasyonunu içermektedir (Tablo 2.1).

Tümör özelliklerine göre T2 kategorisinde akciğerin bir bölümünde atelektazi veya tam olmayan akciğer şişmesi görülebilmektedir. Tümörün karinadan 2 cm'den daha uzakta visseral plevra ve ana bronşa invazyonu bulunmaktadır. Bu, tüm akciğerde atelektazinin geliştiği T3 evresine doğru ilerlemektedir. T3 evresinde tümörün frenik siniri, diyafram, göğüs duvarı ve mediastinal plevral yapılardan herhangi birine invazyonu söz konusudur ve karinadan 2 cm'den daha yakın mesafede ana bronşa yaklaşmıştır. Evre T4 veya invazyon safhası, tümörün mediastinal organları, vertebral gövdeleri ve akciğer karinasını istila ettiği aşamadır (Nooreldeen ve Bach, 2021). Tablo 2.1'de verilen N0-N3 olarak tanımlanan lenf nodu tutulumu ile ilgili olarak, lenf nodu tutulumunun evreye göre lenf nodu olmamasından ipsilateral ve kontralateral tutulumuna kadar değiştiği bilinmektedir (Nooreldeen ve Bach, 2021).

Metastaz, yalnızca bilateral lezyonlar, uzak metastaz ve malign plevral efüzyonun görülebildiği M1 olarak evrelendirilir (Nooreldeen ve Bach, 2021).

Tablo 2.1. Malign tümör sınıflandırmasının TNM evreleme sistemi

Tümör Büyüklüğü(cm)		Lenf Nodu		Metastaz	
T1	<3	N0	Lenf nodu yok	M0	Metastaz yok
T2	T2a 3-5	N1	ipsilateral bronkopulmoner/hiler lenf nodları	M1	Metastaz var
	T2b 5-7				
T3	>7	N2	ipsilateral mediastinal/subkarinal lenf nodları		
T4	invazyon	N3	kontralateral/hiler/mediastinal supraklaviküler lenf nodları		
	mediastinal organları				
	vertebral gövdeleri				
Evre I				Evre II	
IA	T1, N0, M0			IIA	T2b, N0, M0
IB	T2a, N0, M0			IIA	T1, N1, M0
				IIA	T2a, N1, M0
				IIB	T2b, N1, M0
				IIB	T3, N0, M0

Tablo 2.1. (Nooreldeen ve Bach, 2021) yayınından modifiye edilmiştir.

Akciğer kanserinin halk sağlığı açısından en önemli zorluklarından biri, çoğu hastanın (>%75) tanı anında ya evre III veya evre IV'de bulunması ve bu nedenle kötü prognoza sahip olmasıdır. Akciğer kanseri olan hastaların prognozu, hastalığın evresiyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. Örneğin, klinik evre IA hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı yaklaşık %60 iken, klinik evre II-IV hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %40'tan %5'in altına kadar düşmektedir (Nooreldeen ve Bach, 2021).

Hastaların üçte ikisinden fazlası, kliniğe başvurdıklarında bölgesel lenf nodu tutulumu veya diğer organlara metastaz gelişimi göstermektedir (Blandin Knight ve ark., 2017). Bu durumun nedeni, etkili erken teşhis stratejilerinin bulunmamasıdır. Akciğer kanseri genellikle kemoterapi ve radyasyona dirençli olduğundan, metastatik durumda başarılı bir tedavi sağlamak zordur (Blandin Knight ve ark., 2017).

Geçmişte, akciğer kanserini erken evrelerinde tespit etmek için kullanılan tek teşhis yöntemi göğüs radyografisi ve balgam sitolojisi olup, bu yöntemlerin etkinliği kanıtlanmamıştır (Manser ve ark., 2013). 2018 yılında yayınlanan Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) klinik uygulama klavuzuna göre, 55 ila 74 yaşları arasındaki yüksek riskli kişilerde düşük doz bilgisayarlı tomografi ile akciğer kanseri taraması önerilmektedir (Wood ve ark., 2018). Son zamanlarda, genom bilimindeki ilerlemeler, yüksek riskli popülasyonları tanımlamak için kullanılmıştır ve bu, akciğer kanseri taraması için daha uygun gen adayları belirlemede yardımcı olmuştur (Ye ve ark., 2019).

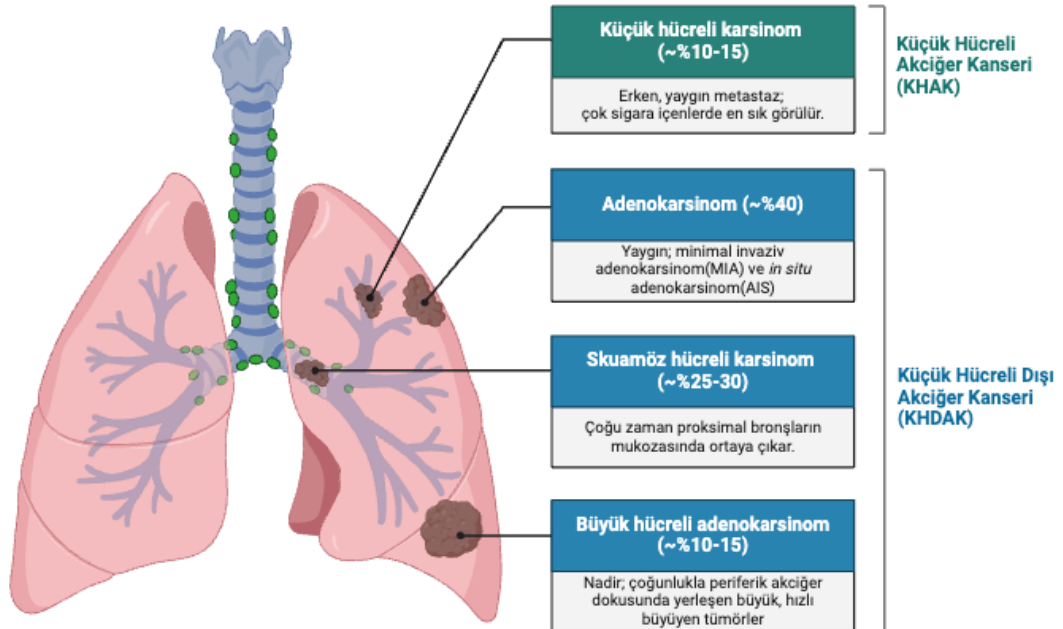
Akciğer kanserine yatkınlık faktörleri ve doğal seyri ile ilgili olarak, patolojik bulgularla birlikte kanserin tanımlanmasını sağlayabilecek bilgi birikimi olmasına rağmen birçok soru hala yanıt bulamamıştır. Preinvaziv lezyonların belirlenmesinin umut verici erken müdahale yöntemleri geliştirebileceğine ve yalnızca klinik olarak doğrulanmış akciğer kanserini hedefleyen tedaviye yönelik çalışmaları öne çıkaracağı düşünülmektedir (Ye ve ark., 2019).

Akciğer kanseri, immünoterapi alanında en çok çalışılan kanserlerden biridir. Bunun nedeni, akciğer kanserinin, proto-onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri etkileyen mutasyonlarla açıklanan genetik değişimlerle birlikte epigenetik değişimler tarafından yönlendirilmesi ve konak immün düzenlemeyi bozmasıdır. İmmün-genomik

teknolojilerdeki gelişmeler, akciğer tümörlerinin moleküler ve genomik düzeyde daha iyi anlaşılması için bir platform sağlamıştır. Akciğer kanseri henüz malign hale gelmeden önce yapılan genomik araştırmalar, kanserin evriminde erken dönemde ortaya çıkan değişiklikleri anlamamıza yardımcı olmaktadır. Bu da kanserin türüne bakılmaksızın uygulanabilecek tedavi yöntemleri (tümör tipi agnostik tedaviler) için hedeflerin belirlenmesine ve dolayısıyla erken teşhis ve tedaviye olanak tanımaktadır (Wong ve Iams, 2021).

2.3. Akciğer Kanserin Histolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırması için altın standart yöntem, bir patolog tarafından doku veya hücre örneklerinin mikroskop altında değerlendirmesidir (Rosai, 2007). Bu değerlendirme klinik açıdan önemli bilgiler sağlayarak tümörün varlığını ve histolojik tipini doğrular (Rekhtman ve ark., 2011; Travis ve ark., 2011; Kadota ve ark., 2015). Şekil 2.1.'de gösterildiği gibi akciğer kanseri, KHAK ve KHDAK olmak üzere iki ana gruba ayrılır. KHDAK; adenokarsinom (ADC) ve varyantları, skuamöz hücreli karsinom (SqCC) ve büyük hücreli akciğer karsinomu (LCLC) olmak üzere üç alt gruptan oluşmaktadır.



Şekil 2.1 Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması (Şekil, Biorender web sitesinde tasarlanmıştır.)

2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflandırılması

KHAK'ın histolojik olarak 2 ana alt grubu vardır. Birincisi, yalnızca KHAK gösteren tümörlerdir; ikincisi ise KHDAK bileşenin bir karışımını içeren KHAK türüdür (Travis ve ark., 2015). KHAK hastalarında tümör hücreleri genellikle yuvarlak veya iğne şeklindedir, yetersiz sitoplazmaya ve ince granüllü nükleer kromatine sahiptir (Travis ve ark., 2015). Mitotik indeksi yüksektir ki bu 2 mm² alanda ortalama 80 mitoz olarak hesaplanır (Nicholson ve ark., 2002; Travis ve ark., 2015).

Tanı genellikle transbronşiyal biyopsi ve/veya sitoloji ile konur. Cerrahi olarak çıkarılan KHAK'lerle nadiren karşılaştırılır (Travis, 2020).

İmmünohistokimya (IHC), tanıda önemli bir yardımcıdır ve hematoksilin-eozin en önemli boya maddesidir. Pansitokeratin vakaların hemen hemen tamamında pozitifdir ve nöroendokrin belirteçlerin (kromogranin, sinaptofizin, nöral hücre adezyon molekülü (CD56), insülinoma ilişkili protein 1 (INSM1)) en az biri genellikle vakaların %90'ından fazlasında pozitif sonuç verir (Yatabe ve ark., 2019). Tiroid transkripsiyon faktör-1 (TTF-1) ekspresyonu, KHAK vakaların %70 ila %80'i arasında görülürken, akciğer kanseri dışında "akustik nöroma" gibi iyi huylu tümöre sahip vakalarda TTF-1 pozitif olduğu literatüre bildirilmiştir (Travis ve ark., 2015; Yatabe ve ark., 2019). Bu nedenle, akciğer kanserine özgü bir belirteç olarak kullanılamaz. KHAK tipik olarak %70 ila %90 arasında yüksek bir antijen Kiel 67 (Ki-67) proliferasyon oranı gösterir (Pelosi ve ark., 2014; Rindi ve ark., 2018).

Küçük biyopsiler ve sitoloji örneklerinde KHAK iyi teşhis edilebilmektedir. Küçük örneklerde, özellikle parçalanmış karsinoid tümörler veya lenfoid lezyonları ayırıcı tanıda immünohistokimya önemlidir. Bu ortamlarda Ki-67 oldukça yararlıdır çünkü KHAK'de Ki-67 proliferasyonu genellikle %50'den fazla olmalıdır, ancak sıklıkla %80 ila %100 arasında değere yakın yüksek bir proliferasyon oranı gösterir (Pelosi ve ark., 2014; Travis ve ark., 2015; Rindi ve ark., 2018). Keratin karşıtı lenfoid belirteçler, KHAK'yi kronik inflamasyon veya lenfoma gibi lenfoid lezyonlardan ayırmaya yardımcı olabilir (Yatabe ve ark., 2019).

Nöroendokrin belirteçler, kromogranin, sinaptofizin, CD56 ve INSM1'den oluşan bir panelde faydalı olabilir. İnceleme CD56 ve INSM1'i içeriyorsa, vakaların %10'unda

tüm nöroendokrin belirteçler negatif olabilir (Yatabe ve ark., 2019). Bu nedenle, tüm nöroendokrin belirteçler negatifse, az sayıda vakada KHAK'yi teşhis etmek mümkündür (Travis ve ark., 2015; Travis ve ark., 2019). Bu gibi durumlarda, TTF-1 de negatifse, p40 boyaması yaparak bazaloid skuamöz hücreli karsinomları dışlamak önemlidir (Yatabe ve ark., 2019).

2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Histolojik Sınıflandırılması

Geçmişte, KHDAK tümörlerini daha fazla sınıflandırmak için, majör tedavi endikasyonları olmadan, KHAK ve KHDAK arasında ayırım yapmak klinik tanının ana odak noktasıydı. Ancak bilimsel gelişmelerle birlikte, moleküler profillemenin ve hedefe yönelik tedavinin ortaya çıkması, KHDAK'yi ADC ve varyantları, SqCC ve LCLC olarak sınıflandırmaya yönlendirmiştir (Herbst ve ark., 2008; Travis ve ark., 2011; Travis ve ark., 2013; Travis ve ark., 2015). Tükürük bezi tipi tümörler, sarkomatoid karsinomlar ve diğerleri dahil olmak üzere, toplam KHDAK vakalarının çok küçük bir bölümünü temsil etmektedir. KHDAK tanısındaki ilk adım, tümörün morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesine dayanan histolojik sınıflandırma ve ardından yardımcı IHC yöntemidir. Küçük biyopsilerde, histolojik özellikler ve IHC fenotipi KHDAK alt tipi için kesin olmadığında, " belirlenemeyen türde " (KHDAK-BTT) terimi kullanılmaktadır (Rodriguez-Canales ve ark., 2016). Bu, tümörün küçük hücreli akciğer kanseri türünde olduğunu ancak daha spesifik alt türünü yani adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom veya büyük hücreli karsinom gibi belirlenemediğini ifade eder.

Adenokarsinom

KHDAK'nin çoğunluğu ADC tiptir ve tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %40'ını oluşturur (Dela Cruz ve ark., 2011). ADC, müsin boyaması veya napsin A veya TTF1 gibi pnömosit belirteç ekspresyonu ile tespit edilebilir. Dolayısıyla ADC, müsin üretimi gösterebilen glandüler farklılaşmaya sahip malign bir epitel tümörü olarak tanımlanır (Travis ve ark., 2015). Genel olarak ADC, akciğerin periferinde bulunur (Shimosato ve ark., 1980; Russell ve ark., 2011; Russell ve ark., 2013). ADC; lepidik, asiner, papiller, mikropapiller ve solid modeller dahil olmak üzere aynı tümörde karıştırılabilen çeşitli histolojik modeller gösterebilir. Lepidik patern olumlu

prognoz ile ilişkilendirilirken, mikropapiller ve solid paternler daha agresif davranış ile ilişkilendirilir (Travis ve ark., 2015; Travis ve ark., 2019).

Solid ADC, SqCC veya LCLC ile karıştırılabilir, bu nedenle TTF-1 veya napsin A'nın müsin üretimi ve IHC ekspresyonu, zorlu vakalarda solid ADC'nin teşhisinde yardımcı olabilir (Travis ve ark., 2015).

Skuamöz Hücreli Karsinom

SqCC, tüm akciğer kanserlerinin %25 ila %30'undan sorumludur (Dela Cruz ve ark., 2011). Genellikle, SqCC bir ana veya lobar bronşta ortaya çıkar ve merkezi bir konumda bulunur (Travis ve ark., 2015).

Histolojik olarak SqCC, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından keratinizasyon ve/veya hücreler arası köprüler gösteren veya skuamöz hücre farklılaşmasının IHC belirteçlerini eksprese eden malign bir epitelyal tümör olarak tanımlanmaktadır (Travis ve ark., 2015)

Keratinizasyon, SqCC'nin ayırt edici özelliği olmasına rağmen, bazı SqCC türleri keratinizasyonun morfolojik özelliklerini göstermeyebilir. Ayrıca, kötü diferansiye SqCC, psödoglandüler görünüm gösterebilirken, kötü diferansiye adenokarsinomlar psödoskuamöz özellikler gösterebilir. Bu durum, küçük biyopsilerin veya sitolojik örneklerin yorumlanmasını zorlaştırabilir (Rekhtman ve ark., 2011; Travis ve ark., 2013; Travis ve ark., 2015).

p40 veya p63 gibi skuamöz hücre farklılaşma belirteçlerini ve sitokeratinler 5/6'yı içeren IHC testleri, zor vakalarda SqCC'nin tanımlanmasında yardımcı olabilir. Ancak, bazaloid skuamöz hücreli karsinom gibi, KHAK ile karıştırılabilen, morfolojik olarak skuamöz hücre farklılaşmasını göstermeyen tam farklılaşmamış malign tümörler bulunabilir. Karakteristik olarak, bu tümörler p40, p63 ve sitokeratinler 5/6 gibi skuamöz hücre farklılaşmasının IHC belirteçleri için pozitifken, TTF-1 negatiftir (Travis ve ark., 2015).

Büyük Hücreli Adenokarsinom

LCLC, tüm akciğer kanserlerinin %10 ila %15'ini oluşturur (Dela Cruz ve ark., 2011). Skuamöz hücre, glandüler veya küçük hücre farklılaşmasının histolojik veya IHC

kanıtı göstermeyen, farklılaşmamış bir KHDAK olarak tanımlanır (Travis ve ark., 2015). LCLC tanısı, SqCC, ADC veya KHAK'yi dışladıktan sonra cerrahi olarak çıkarılmış bir numunenin kapsamlı bir şekilde örneklenmesini gerektirir ve bu nedenle, kor iğne biyopsileri veya sitoloji numuneleri üzerinde yapılamaz (Travis ve ark., 2015).

Bu hücrelerde, müsikarmin gibi müsın boyaması ile tespit edilen müsın üretimi yoktur. İmmünohistokimyasal olarak LCLC, sitokeratinler için pozitif olabilir ancak TTF-1 ve p40 için negatiftir (Travis ve ark., 2015).

LCLC, büyük hücreli nöroendokrin (genellikle TTF-1 ve nöroendokrin belirteçleri ifade eden), solid ADC modeli (TTF-1 pozitif), keratinize olmayan SqCC (p40 pozitif) ve nadiren adenoskuamöz karsinomdan (hem ADC hem de SqCC farklılaşmasını gösteren) ayırt edilmelidir (Travis ve ark., 2015).

2.4. KHDAK Teşhis ve Moleküler Testleri

KHDAK'nin farklı histolojik temellere sahip olmanın yanı sıra, bu alt tiplerin farklı klinik göstergelere ve benzersiz genetik profillere sahip olduğu belirlenmiştir (Pikor ve ark., 2013). ADC'deki en yaygın genetik sürücü mutasyonlar, epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) ve anaplastik lenfoma kinaz (*ALK*) genlerindeki değişiklikleri içermektedir (Pikor ve ark., 2013).

Bilinen aktive edici *EGFR* mutasyonlarının (*EGFRm*) %90'ından fazlasını ekzon 19'da kısa in-frame delesyonlar veya ekzon 21'de aminoasit değişimine neden olan (L858R) nokta mutasyonu oluşturmaktadır (Lynch ve ark., 2004). Hastaların yaklaşık %5'i *ALK* geninde bir yeniden düzenlenme sergiler; bu, genellikle bir ekinoderm mikrotübülü ile ilişkili protein benzeri 4-*ALK* (*EML4-ALK*) füzyonu olarak ortaya çıkar ve bu füzyon molekülü sinyal yolağındaki kendinden sonra gelen hedef moleküllerin anormal aktivasyonuna yol açmaktadır (Amin ve Lai, 2007; Soda ve ark., 2007; Pikor ve ark., 2013).

ADC'li hastaların yaklaşık %1-2'sinde bu hedef molekül; ROS proto-onkogen 1 (*ROS1*) genindeki yeniden düzenlemelerdir. (Li T. ve ark., 2013; Pikor ve ark., 2013). Mitojenle aktive edilen protein kinaz sinyal yolağının aktivasyonuna yol açan B-Raf

proto-onkogen (*BRAF*) mutasyonları (en yaygını V600E mutasyonudur) ADC'li hastaların yaklaşık %2-4'ünde görülür (Pikor ve ark., 2013).

İleri evre KHDAK'da tümörler belirli moleküler mutasyonları içeriyorsa hedefe yönelik tedavi önerilmektedir (Ettinger ve ark., 2017; Kalemkerian ve ark., 2018; Lindeman ve ark., 2018). Bu hassas onkolojik yaklaşımla, EGFR tirozin kinaz inhibitörleri (EGFR-TKI'ler), ALK inhibitörleri, ROS1 inhibitörleri, BRAF inhibitörleri ve immünoterapi (programlı hücre ölümü-1(PD-1)/ programlı hücre ölümü ligand-1(PD-L1) inhibitörleri) dahil olmak üzere hedefe yönelik tedaviler birinci basamakta kemoterapi yerine kullanılmaktadır (Gregg ve ark., 2019).

Literatüre bildirilen Faz III klinik çalışmaları, EGFRm barındıran hastalarda ileri evre KHDAK'nin birinci basamak tedavisi için EGFR-TKI'lerin kullanımını desteklemektedir (Mok ve ark., 2009; Maemondo ve ark., 2010; Mitsudomi ve ark., 2010; Zhou C. ve ark., 2011; Han ve ark., 2012; Rosell ve ark., 2012; Wu Y.-L. ve ark., 2014; Soria J. C. ve ark., 2017; Sequist ve ark., 2023).

Birinci nesil TKI olan krizotinib ile birinci basamak tedavi, *ALK* yeniden düzenlemesi pozitif (*ALK*+) ileri evre KHDAK'li hastalarda platin içeren kemoterapiye kıyasla progresyonsuz ortalama sağkalım (PFS) süreci önemli ölçüde uzatmıştır (sırasıyla 10,9'a karşı 7 ay) (Solomon ve ark., 2014). Krizotinib, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. Food and Drug Administration (FDA)) tarafından Faz I ve II çalışmalarında ortalama PFS'si 9,1 ila 19,2 ay olan ROS1-pozitif veya *ALK*+ ileri evre KHDAK'nin tedavisi için onaylanmıştır (Shaw ve ark., 2014) (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/202570s033lbl.pdf Erişim tarihi: 3 Ekim 2024).

Birinci nesil ALK inhibitörlerinden sonra ikinci nesil ALK inhibitörleri seritinib, alektinib ve brigatinib, krizotinib bulunmuştur ve bunların da platin içeren kemoterapiye kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. İkinci nesil ALK inhibitörleri, *ALK*+ metastatik KHDAK'nin birinci ve sonraki basamak tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Peters ve ark., 2017; Camidge ve ark., 2018; Soria J.-C. ve ark., 2018) (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/211225s000lbl.pdf

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/208434s000lbl.pdf ,
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208772lbl.pdf Erişim
tarihi: 3 Ekim 2024).

2018 yılında, üçüncü nesil ALK inhibitörü lorlatinib, ALK+ metastatik KHDAK'li hastalar için FDA tarafından hızlandırılmış onayı almıştır. Bu hasta grubunda, krizotinib ve en az bir diğer ALK inhibitörü kullanımına rağmen; veya ilk ALK inhibitörü tedavisi olarak alektinib veya seritinib kullanımına rağmen hastalık ilerlemiştir

(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210868s000lbl.pdf,
Erişim tarihi: 3 Ekim 2024) (Solomon ve ark., 2018).

BRAF V600E mutasyonuna sahip metastatik KHDAK'li daha önce tedavi görmemiş ve önceden tedavi görmüş hastalarda, dabrafenib ve trametinib kombinasyonu, sırasıyla %64 ve %63,2'lik genel yanıt oranları göstermiştir. Bu hastalar için FDA tarafından onaylanan ilk tedavi rejimi dabrafenib ve trametinib kombinasyonudur (Planchard ve ark., 2016; Planchard ve ark., 2017), (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/204114s009lbl.pdf,
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/202806s010lbl.pdf
Erişim tarihi: 3 Ekim 2024)

İleri evre KHDAK hastalarında tümör hücrelerinde %50'den yüksek PD-L1 ekspresyonu varsa, birinci nesil ilaç olan pembrolizumab monoterapisi verilenlerde ortalama PFS'si 26.3 ay hesaplanırken kemoterapi verilenlerde ortalama PFS'si 13.3 ay bulunmuş ve pembrolizumabın daha etkili olduğuna varılmıştır (Reck ve ark., 2016) (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/125514s034lbl.pdf,
Erişim tarihi: 3 Ekim 2024)

Lisberg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise tümör PD-L1 ekspresyonu %1'den fazla olan EGFRm ilerlemiş KHDAK'li ve TKI tedavisini daha önce almamış hastalarda pembrolizumab monoterapisine ilişkin Faz II klinik denemesi etkinlik eksikliği nedeniyle erken sonlandırılmıştır. Dolayısıyla pembrolizumabın bu hasta popülasyonu için uygun bir tedavi olmadığını ileri sürmüşlerdir (Lisberg ve ark, 2018)

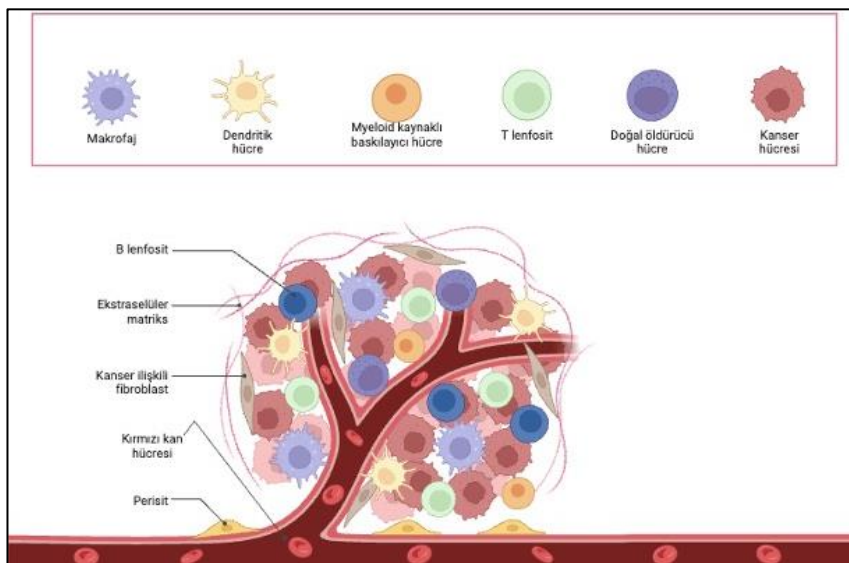
Ayrıca Ganior ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, tek ajanlı immünoterapinin, EGFRm veya *ALK*⁺ olan hastalar için en uygun tedavi stratejisi olmayabileceğini göstermişlerdir. Çünkü, PD-1/PD-L1 inhibitör tedavisi alan hastalar, EGFRm-negatif veya *ALK*-negatif/bilinmeyen KHDAK hastalarla kıyaslandığında düşük objektif yanıt oranı bulunmuştur (Gainor ve ark., 2016)

Lee ve arkadaşları yaptıkları meta analiz çalışmasında ise, EGFRm tümörlü hastalarda Taxotere markası altında satılan ve tümör hücre mikrotübüllerini hedef alarak kanser hücresinin büyümesini engelleyen kemoterapi ilacı docetaxele karşı immünoterapi (nivolumab, pembrolizumab veya atezolizumab) ile genel bir sağkalım avantajı görülmemiştir (Lee C. K. ve ark., 2018).

KHDAK tanısı sırasında tümör genotipinin erken tanımlanması, diğer tedaviler düşünülmeden önce en etkili tedavinin reçete edilebilmesi için kritik öneme sahiptir. Tedaviye başlamadan önce ilgili mutasyonların tanımlanmasını sağlamak için hedeflenen ajanlar için FDA onaylı tanı testleri de mevcuttur (Gregg ve ark., 2019).

2.5. Akciğer Tümör Mikroçevresi

Tümör Mikroçevresi (TME), tümör hücrelerini çevreleyen ortamdır. Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi TME heterojen olup; bağışıklık hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri ve nöronal hücreler, bunların hücre dışı matriks (ECM) proteinleri, sinyal molekülleri ve çevredeki kan damarlarından oluşmaktadır (Kozlova ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Tümör mikroçevresi (Biorender.com kullanılarak hazırlandı.)

TME, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) teşvik etme, tümör infiltrasyonunu kolaylaştırma ve immün supresyona katkıda bulunma dahil olmak üzere birçok mekanizma yoluyla tümör oluşumuyla ve kanser ilerlemesi ile yakından ilişkilidir (Mittal ve ark., 2016). Akciğer kanseri mikro ortamı, mekanik özellikler, asidik koşulları ve sinyal molekülleri dahil olmak üzere TME'nin heterojenliğinden kaynaklanabilecek belirgin tümör içi heterojenite ile karakterizedir (Trdan ve ark., 2007).

Tümör agresifliği ve malignite derecesi sadece tümörün kendisine değil aynı zamanda mikroçevreye de bağlıdır. TME sadece tümör hücrelerini değil, aynı zamanda stromal hücreler, infiltre enflamatuvar hücreler, kanser kök hücreleri sitokin ve büyüme faktörleri gibi tümör hücresinin büyümesi ve göçünü destekleyici hücresel olmayan bileşenleri içermektedir (Lin Y.-H. ve ark., 2018). Bu hücreler ve bileşenler sayesinde tümör için uygun bir büyüme mikro ortamı sağlanır ve tümör hücrelerinin ihtiyaç duyduğu sinyallerle birlikte metabolitler karşılanmaktadır (Yuan Y. ve ark., 2016).

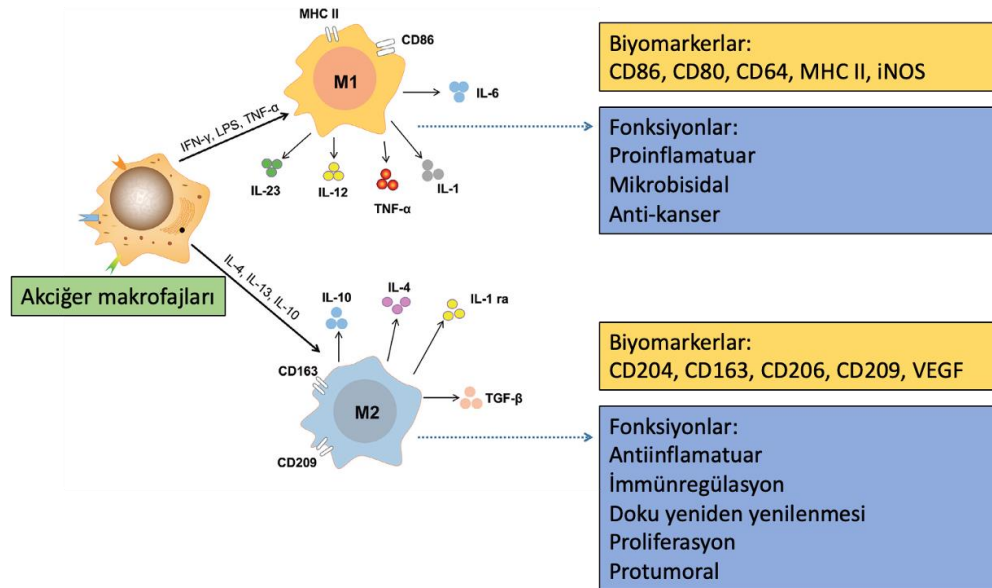
TME'de en bol bulunan bağışıklık hücreleri olan makrofajlar, güçlü plastisite ve heterojenlik göstermektedir (Sedighzadeh ve ark., 2021). TME'de tümör hücreleri normal makrofajları tümör mikroçevresine alır. Sonrasında, makrofajların fenotiplerini ve fonksiyonlarını değiştirmek için makrofajları "yeniden eğitir" (Bosco, 2019). alışmalar, makrofajların tümörlerin prognozu ile belirli bir korelasyona sahip olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmamızda, esas olarak KHDAK hastalarında makrofaj farklılaşması/polarizasyonu ile prognozun kötü seyretmesi üzerine etkisi olup olmadığı ve bu süreçte etkili olabilecek  protein üzerinde araştırmanın yapılması planlandığından 2.5.1 alt başlığında öncelikli olarak makrofajların orjini, makrofajların kanser ile ilişkisi, özellikle akciğer kanserinde rolü ve makrofaj polarizasyonu hakkında bilgilendirme yapılmıştır.

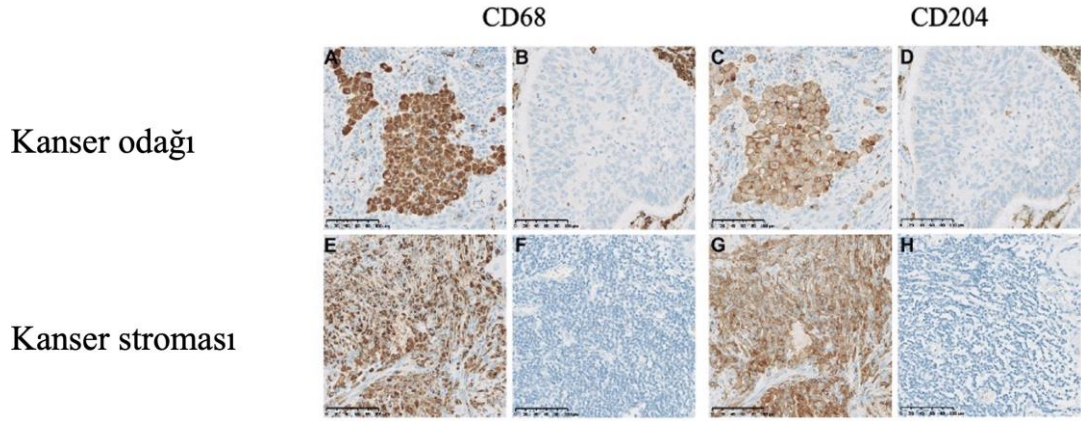
2.5.1. Makrofajlar

Makrofajlar vücudun doğuştan gelen bağışıklık sistemine aittir ve patojenlerin uzaklaştırılması ve vücut homeostazında önemli rol oynar. Güçlü plastisiteye ve heterojenliğe sahip makrofajlar, birçok solid tümörün mikroçevresinde en bol bulunan

bağışıklık hücreleridir. Mikroçevre değiştiğinde, makrofajların fenotipi ve işlevi de buna göre değişir (Sedighzadeh ve ark., 2021). Makrofajlar esas olarak M1 ve M2 tiplerine ayrılır (Biswas ve ark., 2012) M1 tipi makrofajlar, interferon gama (IFN- γ), lipopolisakarit (LPS) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) tarafından aktive edilmektedir. M1 makrofajlar, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi pro-inflamatuar faktörleri serbest bırakarak tümör aktivitesini inhibe edebilmektedir. M2 makrofaj polarizasyonu, IL-4, IL-13 ve IL-10 gibi farklı uyarıcı faktörler tarafından indüklenebilmektedir. M1 makrofajlarının en yaygın yüzey markerları CD80, CD86 ve CD64 iken, M2 makrofajlarının ortak karakteristik proteinleri arasında CD206, CD163 ve CD204 bulunmaktadır (Mantovani ve ark., 2004; Stout ve Suttles, 2004; Martinez ve ark., 2008; Sica ve Mantovani, 2012; Liu Y.-C. ve ark., 2014). M2 makrofajları, inflammatuar reaksiyonların oluşumunu engelleyebilir ve doku yeniden şekillenmesini ve anjiyogenezi düzenleyebilir. TME’de tümör hücreleri makrofajları tümör mikroçevresine çağırıp, fenotiplerini ve fonksiyonlarını değiştirmek için makrofajları "yeniden eğitir"(Bosco, 2019). Bu nedenle, klinik çalışmalar genellikle mikroçevredeki farklı makrofajları bu spesifik biyomarkerlar sayesinde tanımlamaktadır (Li Z. ve ark., 2018) Akciğer makrofajlarının M1 ve M2 polarizasyonu Şekil 2.3.’te özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Akciğer makrofajlarının M1 veya M2 polarizasyonu. IFN- γ , interferon gama; LPS, lipopolisakarit; TNF- α , tümör nekrozis faktör-alfa; MHC, doku uyumluluk kompleksi; iNOS, indüklenebilir nitrik oksit sentaz; IL, interlökin; TGF- β , doku büyüme faktörü-beta; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü (Li Z. ve ark., 2022) makalesinden modifiye edilmiştir.



Şekil 2.4 Makrofajların KHDAC'nin kanser odağında ve kanser stromasındaki dağılımı (Li Z. ve ark., 2018). KHDAC'nin makrofajlar için CD68 veya CD204 antikorları ile immüno boyanması. A. Kanser odağında yüksek sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. B. Kanser odağında düşük sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. C. Kanser odağında yüksek sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar. D. Kanser odağında düşük sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar. E. Kanser stromasında yüksek sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. F. Kanser stromasında düşük sayıda CD68+ TAM bulunan vakalar. G. Kanser stromasında yüksek sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar; H. Kanser stromasında düşük sayıda CD204+ TAM bulunan vakalar. Şekil üzerinde modifiye edilerek kullanılmıştır.

Makrofajlar ve Kanser

Kanserin ortaya çıkışı ve gelişimi karmaşık, kademeli bir süreçtir (Yuan Y. ve ark., 2016). Çoğu tümör, hücre bölünmesine yönelik devamlı sinyal alımı, hücre ölümüne direnç, kontrolsüz çoğalma, anjiyogenezin indüksiyonu, bağışıklık gözetiminden kaçış ve invazyon özelliklerine sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Makrofaj, tümör mikroçevresindeki kritik bir bağışıklık hücresi tipidir ve dolaşımdaki monositlerden türetilir. Makrofajlar tümör büyümesi ve invazyonuyla ilişkilidir (Noy ve Pollard, 2014), bu da neoplastik dönüşüm ve bağışıklık kaçışını destekleyebilir (Williams ve ark., 2016). *In vivo* ve *in vitro* deneylerde, M2 makrofajlarının tümör hücrelerinin invazyonunu ve göçünü teşvik ettiği gösterilmiştir (Chen P. ve ark., 2017a; Chen Y. ve ark., 2017b). Makrofajların polarizasyon durumu kanserin evresiyle ilişkilidir (Hung ve ark., 2018). Meme kanserine yönelik bir fare modelinde, M2 makrofajlarının stromada en fazla bulunan hücreler olduğu gösterilmiştir. Bu da M2 makrofajların tümör hücrelerinin bağışıklık gözetiminden kaçmasına olanak sağlayabileceğini ve kanser gelişimini destekleyici olabileceğini düşündürmüştür (Quail ve Joyce, 2013; Lin L. ve ark., 2015a). Tümör mikroçevresindeki M2 makrofajların yoğunluğu genellikle kötü prognozla ilişkilidir. Ayrıca, kemokinler, inflammatuar faktörler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli sitokinleri serbest bırakarak solid tümörlerin metastazını desteklemektedir (Cho H. J. ve ark., 2012; Kawata ve ark.,

2012). CD163-pozitif makrofajların, pankreatik duktal karsinom hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunu destekleyebildiği; dolayısıyla pankreas duktal karsinomu olan hastalarda kötü prognozla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Tsukamoto ve ark., 2019).

Stromaya sızan M2 makrofajların yoğunluğunun, pankreas duktal karsinomu hastalar için bağımsız bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Hu ve ark., 2016).

Bir başka çalışmada ise cerrahi olarak tedavi edilen kolon kanseri hastalarında tümörlerdeki makrofajların dağılımı ve yoğunluğu, kolon kanserinin nüksetmesi açısından bağımsız risk faktörleri olarak belirtilmiştir (Kim Y. ve ark., 2018). Bu veriler doğrultusunda tümör prognozu ile makrofajlar arasındaki ilişkiye odaklanan araştırmalar yoğunluk kazanmıştır.

Makrofajlar ve KHDAK

Artan sayıda çalışma, makrofajlar ile KHDAK'nin prognozu arasındaki ilişkiyi keşfetmeye çalışmaktadır. Makrofajların fenotipi, yoğunluğu ve dağılımının KHDAK hastalarının prognozunu etkilediği bulunmuştur (Tablo 2.2).

Akciğer tümörlerinde makrofaj yoğunluğu ile sağkalım açısından hasta sonuçları arasındaki ilişkiye dair çeşitli raporlar çelişkili sonuçlar vermiştir. Kawai ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kanser odağındaki makrofaj sayısının ve stromanın değerlendirilmesinin, kemoterapi ile tedavi edilen IV. evre KHDAK hastalarının prognozunu tahmin etmek için yararlı biyobelirteçler olduğunu, çünkü kanserin odağında kanser stromasına göre daha fazla tümör infiltre edici makrofajı olan hastaların önemli ölçüde daha iyi bir sağkalım süresi gösterdiğini belirtmiştir (Kawai ve ark., 2008). Benzer şekilde başka bir çalışmada, kanser odağına çok sayıda makrofajın infiltrasyonunun, KHDAK için olumlu bir bağımsız prognostik faktör olabileceğini göstermiştir (Kim D. ve ark., 2008).

Welsh ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, diğer iki araştırmada olduğu gibi kanser odağında CD68-pozitif makrofajların yoğunluğunun, KHDAK hastalarında hayatta kalmanın güçlü ve bağımsız bir belirleyicisi olduğunu göstermiştir (Welsh ve ark., 2005).

Dai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise; kanser odağında makrofaj sayısının hastanın hayatta kalma süresiyle pozitif ilişkili olduğunu ancak, kanser stromasındaki makrofajların sayısının hastanın hayatta kalma süresiyle negatif ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (Dai ve ark., 2010).

KHDAK'nin, klinik tedavi için önemli faktörler olan *EGFR*, *KRAS* vb. gen mutasyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ancak yapılan çalışmalarla kanser odağında yüksek makrofaj infiltrasyonu hastaların sağkalımının gelişmesinde korelasyon gösterirken, rezekte KHDAK'de gen mutasyonları veya gen kopya sayısı ile aynı korelasyon gösterilememiştir (Kim D. ve ark., 2008).

Kanser odağındaki makrofajların sayısı hastanın hayatta kalma süresiyle pozitif ilişkili olabilirken, kanser stromasındaki makrofajların sayısı hastanın hayatta kalma süresiyle negatif ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, tümör mikroçevresindeki farklı konumlardaki makrofajların neden farklı hasta sonuçlarına katkıda bulunduğuna dair çok az araştırma yapılmıştır (Li Z. ve ark., 2022).

Tablo 2.2 Tümörle ilişkili makrofajlar ve akciğer kanseri prognozu

Ülke	Tümör Tipi	Çalışma Tarihi	Yöntem	Marker	Olgu sayısı	Makrofaj Dağılımı ve Prognoz	Referans
İngiltere	KHDAK	1991-1994, 1999-1999.12	IHC	CD68	175	Tümör odasında yüksek makrofaj yoğunluğu: daha iyi hayatta kalma Tümör stromasında yüksek makrofaj yoğunluğu: kötü hayatta kalma	Welsh ve ark., 2005
Japonya	KHDAK Evre IV	1996.1-2004.12	IHC	CD68	199	Tümör odasında makrofajlar > tümör stromasında makrofajlar: daha iyi hayatta kalma; Tümör odasında makrofajlar < tümör stromasındaki makrofajlar: kötü hayatta kalma	Kawai ve ark., 2008
Kore	KHDAK	1997.1-1998.12	IHC	CD68	144	Tümör odasında yüksek makrofaj yoğunluğu: daha iyi hayatta kalma Tümör stromasında makrofaj sayıları hayatta kalmayla ilişkili değil	Kim ve ark., 2008
İngiltere	KHDAK(Evre I, II, IIIa, IV)	1991-1994, 1999-1999.12	IHC	M1: iNOS, HLA-DR, MRP 8/14, TNF-α, M2: CD163, VEGF	40	Tümör odasında M1 makrofajları > tümör odasında M2 makrofajları: daha iyi hayatta kalma	Ohri ve ark., 2009
Çin	KHDAK	1999.8-2001.8	IHC	CD68	99	Tümör odasında yüksek makrofaj yoğunluğu: daha iyi hayatta kalma Tümör stroma yüksek makrofaj yoğunluğu: kötü hayatta kalma Tümör odasında makrofaj/tümör stroma makrofaj oranı: daha iyi hayatta kalma	Dai ve ark., 2010
Çin	KHDAK	1999.6-2001.8	IHC	M1: CD68, HLA-DR M2: CD68, CD163	100	Tümör stroması ve odasında daha yüksek M1 makrofaj yoğunlukları: daha iyi hayatta kalma; M2 makrofaj yoğunlukları hastanın hayatta kalmasıyla ilişkili değildi	Ma ve ark., 2010
Japonya	Akciğer adenokarsinom	1996.1-1998.3	IHC	M2:CD68, CD204	170	CD204-pozitif makrofajlar: tümörü teşvik eden fenotip	Ohtaki ve ark., 2010
Çin	Akciğer adenokarsinom Evre I, II, III, IV	2003-2006	IHC	M1: CD68, iNOS M2: CD68, CD206	65	M2-polarize makrofaj: kötü prognoz	Zhang ve ark., 2011
Japonya	Akciğer adenokarsinom Evre I	1995.1-2007.12	IHC	M2:CD204	106	İntravasküler CD204(+) makrofajlar: niçiks olan hastalarda daha yüksek	Kaseda ve ark., 2013
Japonya	Akciğer skuamöz hücreli karsinom	2000.1-2006.12	IHC	M2:CD204	208	CD14 (+)CD204(+): kanser hücrelerinin metastazi	Maeda ve ark., 2014
Japonya	Akciğer skuamöz hücreli karsinom	2000.1-2006.12	IHC	M2:CD204	208	tümör stromasında daha yüksek sayıda CD204 (+) TAM: kötü klinik sonuç	Hirayama ve ark., 2012
Çin	Akciğer adenokarsinom Evre I	2004-2011	IHC	M2:CD204	182	Yüksek yoğunluklu grupta 5 yıllık hastalaksız sağkalm (DFS) oranı CD204; daha kötü; CD204 düşük yoğunluklu grubun 5 yıllık hastalaksız sağkalm (DFS) oranı: daha iyi	Sun ve Xu, 2018
Livanya	KHDAK	2012.9-2015.4	IHC	M1: CD68, iNOS M2: CD68, CD163	80	Tümör odasında M1 makrofajlarının yüksek düzeyde infiltrasyonu: daha iyi hayatta kalma; Tümörün stroma ve odasında toplam M2 makrofajlarının yüksek infiltrasyonu: kötü hayatta kalma	Jackute ve ark., 2018
Japonya	KHDAK	2005-2013	IHC	M2:CD68, CD204	297	Tümör stromasında daha yüksek sayıda CD204-pozitif TAM: bağımsız bir kötü prognostik belirleyici	Li ve ark., 2018
İsveç	KHDAK	2006-2010	IHC	M2:CD68, CD163	352	CD163-pozitif makrofajların düşük oranı: yüksek hayatta kalma oranı	La Fleur ve ark., 2018
Norveç	KHDAK Evre I, II, III	1990-2010	IHC	M1: CD68, HLA-DR; M2: CD68, CD204; CD68, CD163	696	Metastatik lenf nodlarındaki M1 makrofajları: pozitif prognostik belirteç	Rakce ve ark., 2019
Çin	KHDAK Evre I, II, III	2012-2014	IHC	M2:CD68, CD163	137	Tümör odasında yüksek M2 makrofaj infiltrasyonu: kötü prognoz	Cao ve ark., 2019
Japonya	KHDAK	2011.11-2014.10	IHC	M2:CD163	160	Tümör stromasında M2 makrofajların yüksek infiltrasyonu: kötü prognoz. Alveollerde M2 makrofajlarının yüksek infiltrasyonu: kötü prognoz	Sumitomo ve ark., 2019a
Almanya	KHDAK(akciğer skuamöz hücreli karsinom)	/	RNA Sekanslama, qRT-PCR, IFC	CD68, IL-12, CCR7, CD163, ALOX15	104	M1 makrofajlarının daha yüksek uzaysal yoğunluğu: daha uzun genel hayatta kalma; M2 makrofajlarının daha yüksek uzaysal yoğunluğu: genel hayatta kalma oranının azalması	Zheng ve ark., 2020
Amerika	KHDAK	2010.1-2012.12(n=102), 1993-2004(n=247)	IHC	CD68, CD163, VEGF-A, VEGF-C	349	Yüksek M2 oranı (CD163+/CD68+) kötü genel sağkalımla önemli ölçüde ilişkili	Hwang ve ark., 2020

KHDAK'de makrofaj farklılaşması

Yapılan çalışmalar, vücudun bağışıklık tepkisinin kanserin gelişmesinde, engellenmesinde veya ilerlemesinde kritik bir rol oynadığını, bağışıklık hücrelerinin aktivitesi ve tipinin, tümörü teşvik edici ve anti-tümör etkileri arasındaki dengeyi etkileyebileceğini göstermiştir (Murata, 2018; Nagahashi ve ark., 2018). Daha ileri araştırmalarda, tümör mikroçevresi değiştiğinde makrofajların fenotipinin ve fonksiyonunun da değiştiğini, M1 ve M2 makrofajlarının vücudun bağışıklık tepkisinde farklı roller oynadığı bulunmuştur. M2 makrofajları, KHDAK hücreleri A549'un invazyonunu ve büyümesini destekleyebilirken, M1 makrofajları, A549 hücrelerinin sisplatine duyarlılığını artırabildiği ve apoptozu indükleyerek tümör mikroçevresinde anjiyogenez yeteneğini azaltabildiği gösterilmiştir (Yuan A. ve ark., 2015).

Ohri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sağkalımı uzamış (ortalama 92.7 ay) hastalardan alınan 20 patolojik doku örneğinin ve sağkalımı zayıf (ortalama 7.7 ay) hastalardan alınan 20 patolojik doku örneğinin immünohistokimyasal analizinde, kanser odağındaki M1 makrofaj yoğunluğunun, sağkalımı uzamış hastalardaki M2 makrofaj yoğunluğundan anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada daha uzun hasta sağkalım süresinin, kanser odağındaki M1 makrofajlarının sitotoksitesi ile ilişkili olabileceği vurgulanmış, hücrel immün tepkilerin ise, tümör hücresi büyümesini inhibe etmede önemli bir rol oynadığı görülmüştür (Ohri ve ark., 2009). Daha sonra Mae ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; sırasıyla M1 ve M2 makrofajlarını ayırt etmek için HLA-DR ve CD163 kullanılmıştır. Kanser odağındaki M1 makrofaj yoğunluğu uzun sağkalım gösteren hasta grubunda, kısa sağkalım süresi olan hastalara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Oysaki, uzun sağkalım ve kısa sağkalım grupları arasında M2 makrofaj yoğunluğu açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır (Ma ve ark., 2010).

Bir yıl sonra yapılan çalışmada, akciğer adenokarsinomunda, prognozu kötü olan hastaların tümör mikroçevresinde M2 makrofajların lenf anjiyogenezi hızlandırdığı ve lenf nodu metastazının ilerlemesine neden olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır (Zhang B. ve ark., 2011).

Ohtaki ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CD204 pozitif makrofajların akciğer adenokarsinomunda TAM'lerin tümörü teşvik eden fenotipini açıkça yansıttığını bulmuşlardır (Ohtaki ve ark., 2010). Hirayama ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, akciğer SqCC'de CD204 pozitif makrofajlar ve diğer tümörü destekleyen stromal hücrelerin tümörü destekleyen mikroçevreler oluşturabileceği fikrini öne sürmüşlerdir (Hirayama ve ark., 2012). Kaseda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise, patolojik evre I akciğer adenokarsinomu olan hastalarda çok sayıda intravasküler CD204 pozitif makrofajın rekürrensının önemli bir belirleyicisi olduğunu göstermişlerdir (Kaseda ve ark., 2013). Maeda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, dolaşımdaki CD14 CD204 pozitif makrofajların kanser hücrelerinin metastazına katkıda bulunduğunu, dolaşımdaki CD14 CD204 pozitif makrofaj aktivitesinin bloke edilmesinin ise rezeke KHDAK'li hastalarda postoperatif nüksü önleyebileceğini göstermişlerdir (Maeda ve ark., 2014). Sun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yüksek yoğunluklu CD204 makrofaj ekspresyonunun akciğer adenokarsinomunun agresifliği ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (Sun Y. ve Xu, 2018)

Jackute ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, KHDAK'deki makrofajların farklı özelliklerini detaylı olarak araştırdıkları bir çalışmada; KHDAK'li 80 hastanın tümör dokularında immünohistokimya yöntemiyle M2 makrofajlarının esas olarak tümör stromasında olduğunu saptamışlardır. M1 makrofajlarının kanser odağındaki yüksek infiltrasyonunu, KHDAK'de genel sağkalım artmasıyla, toplam M2 makrofajlarının stroma ve odadaki yüksek infiltrasyonunu, KHDAK'de kısa sağ kalım süresiyle ilişkilendirmişlerdir (Jackute ve ark., 2018). Jackute ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu olarak, Li ve arkadaşlarının 297 KHDAK'li hastadan tümör dokularıyla yaptığı çalışmada CD204-pozitif M2 TAM'lerin KHDAK'de, özellikle de akciğer adenokarsinomunda prognostik tahmin amaçlı tercih edilebilir bir belirteç olduğunu göstermişlerdir (Li Z. ve ark., 2018). La Fleur ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, adenokarsinomlu hastaların hayatta kalma oranlarını hesaplamışlardır. CD163 pozitif makrofaj oranı düşük olan hastaların üç yıllık hayatta kalma oranının %62,3 olduğunu, CD163 pozitif makrofaj oranı yüksek olanların ise %49,1'lik üç yıllık hayatta kalma oranına sahip olduğunu bulmuşlardır (La Fleur ve ark., 2018). Başka bir çalışmada, M1 TAM seviyesinin stromal infiltrasyonunun KHDAK'li hastaların patolojik evre I'den III kadar anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (Rakaee ve ark., 2019). Cao

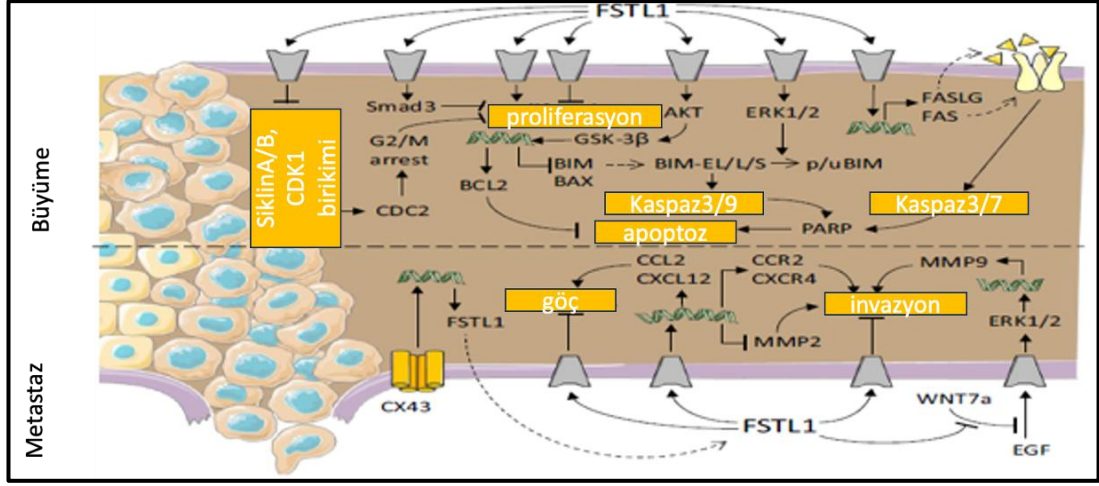
ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kanser odağındaki M1 makrofajların kademeli olarak M2 makrofajlarına dönüştüğü ve M2 makrofajların yüksek infiltrasyonunun KHDAK'de kötü prognoz ile ilişkili olduğu göstermiştir (Cao ve ark., 2019). Bu çalışmayı, Sumitomo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada KHDAK'nin ilerlemesi sırasında M2 makrofajların, tümör hücresi agresifliğini ve çoğalmasını indükleyebildiği dolayısıyla metastatik potansiyeli artırarak hastalarda kötü prognoza yol açabildiğini bularak desteklemişlerdir (Sumitomo R. ve ark., 2019). KHDAK hastaların daha yüksek M1 ve daha düşük M2 yoğunluğuna sahip olanları, önemli ölçüde daha iyi genel sağkalım oranları gösterdiğinden, makrofajların uzaysal yoğunluğu ve dağılımı, hastanın prognozunu öngörmeyi sağlayabilmiştir (Zheng ve ark., 2020). 2020 yılında yapılan bir başka çalışmada, TAM'lerin anjiyogenez ve lenf anjiyogenezle önemli ölçüde ilişkili olduğu, KHDAK'nin ilerlemesine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada, yüksek M2 oranının (CD163+/CD68+), KHDAK hastalarında kötü prognozun güçlü bir göstergesi olacağı belirtilmiştir (Hwang ve ark., 2020).

Yapılan çalışmaları özetlemek gerekirse, makrofaj yoğunluğunun hasta prognozu ile belli bir ilişkisi vardır. Dokularda M1 makrofaj oranının yüksek, M2 makrofaj oranının düşük olması hastanın prognozu açısından faydalı olabilecektir. Bunun nedeni M1 makrofajlarının vücutun inflamatuvar yanıtını teşvik edebilen sitotoksitesisi olabilirken, M2 makrofajları vücutun inflamatuvar yanıtını inhibe etme ve tümör büyümesini destekleme etkisine sahip olmasıdır. Bu yüzden, TAM'lerin konumu ve M1/M2 polarizasyonu, potansiyel olarak KHDAK prognozunun bağımsız belirleyicileri olabilir.

Tümör mikroçevresinde makrofaj polarizasyonu, mikroçevrenin tümöre elverişli ya da elverişsiz hale gelmesi açısından bu kadar önemliyken, tümör hücreleri tarafından sentezlenip makrofaj polarizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerin anlaşılması da önem arz etmektedir. Literatürü incelediğimizde, makrofaj aktivasyonunu etkilediği öne sürülen FSTL1, OPN, HMGB1 gibi sitokin özelliğine sahip proteinler ön plana çıkmaktadır.

2.6. Follistatin-Like Protein 1

FSTL1 (FRP, TSC-36), hücre dışı kalsiyum bağlayabilme kapasitesine sahip olan ve follistatin benzeri alanlar içeren BM-40/SPARC (osteonektin) ailesine ait ekstrasellüler bir glikoproteindir. Hemen hemen tüm hücre tiplerinde eksprese edilen bu protein, hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi pek çok biyolojik süreçlerde etkilidir (Liu S. ve ark., 2006; Esterberg ve ark., 2008; Oshima ve ark., 2008; Ouchi ve ark., 2008). FSTL1, ilk olarak TGF- β ile indüklenebilir gen olarak osteoblastik hücre hattından klonlanmıştır (Shibanuma ve ark., 1993); ayrıca akciğerde morfogenez sürecinde trakeal kıkırdak oluşumuyla ve kemik morfogenetik proteini (BMP) sinyali yoluyla alveoler olgunlaşma için gereklidir (Geng ve ark., 2011). FSTL1'in pek çok kanser türünde migrasyonu engellediği, kanser hücrelerinin çoğalmasını azalttığı ve apoptozu teşvik ettiği bulunmuştur (Chan ve ark., 2009; Zhao ve ark., 2011; Chen S. X. ve ark., 2014). İnsan akciğer adenokarsinom (PC-14) ve küçük hücreli akciğer karsinom (H446) hücre hatlarına (Sumitomo K. ve ark., 2000; Chiou ve ark., 2017; Ni ve ark., 2018) over, endometriyal (Chan ve ark., 2009), nazofarengiyal (Zhou X. ve ark., 2016) ve meme kanseri (An ve ark., 2017) hücre hatlarına FSTL1 transfekte edildiğinde, FSTL1'in bilinmeyen sinyal yolağı üzerinden tümör büyümesini azalttığı gözlemlenmiştir. Ardından yapılan çalışmalarda bilinmeyen bu sinyal yolağının belirlenmesine odaklanılmıştır. FSTL1'in tümör büyümesini inhibisyonunda kullandığı yolaklardan birinin, kendisinin TGF- β indüklü bir gen olması nedeniyle beklenildiği gibi Smad2/3 fosforilasyon yolağı olduğu saptanmıştır (An ve ark., 2017). KHDAC hücre hatlarında ise, her ikisi de insan akciğer adenokarsinomu kökenli olan CL1-5 hücre hattında FSTL1 aşırı eksprese olduğunda tümör büyümesi inhibe olurken, CL1-0 hücre hattında FSTL1 ekspresyonu azaldığında tümör büyümesi indüklenmiştir (Chiou ve ark., 2017).



Şekil 2.5. FSTL1'in tümör büyümesi ve metastazındaki işlevi (Mattiotti vd., 2018). Şekil modifiye edilerek kullanılmıştır.

FSTL1'in tümör büyümesindeki rolü araştırılırken tümör metastazındaki rolünü tespit etmek için de *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. İnsan melanoma hücre hatlarında FSTL1'in siRNA ile susturulması ile migrasyonla ilişkili C-C Motif Kemokin Ligandı 2 (CCL2) ve C-X-C Motif Kemokin Ligandı 12 (CXCL12) ve kemik metastazı oluşumu ile ilişkili C-C Motif Kemokin Reseptör 2 (CCR2) ve C-X-C Motif Kemokin Reseptör 4 (CXCR4) genlerin ekspresyonu da inhibe olmuştur (Kudo-Saito ve ark., 2013). Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231'de metastatik özellikteki varyantı MDA-MB-231-BR'ye kıyasla FSTL1 ekspresyonunun düşük olduğu gösterilmiştir (An ve ark., 2017). Kudo-Saito ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, *in vivo* olarak FSTL1'i bloke ettiklerinde, subkutan tümörlerin büyümesi ve kemik metastazının baskılandığını göstermişlerdir (Kudo-Saito ve ark., 2013). FSTL1'in metastaz üzerindeki etkisini inceleyen başka bir çalışmada, FSTL1'in spesifik olarak WNT7a'ya bağlandığı ve onun inhibitör etkisini antagonize ettiği, bu yolla da MMP-9 ekspresyonunda artışa yol açtığı bulunmuştur (Sundaram ve ark., 2017). Konneksin-43 overekspresyonu ile metastatik kapasitesi inhibe edilmiş akciğer dev karsinoma hücre hattında, ortama FSTL1'e karşı antikorlar verildiğinde metastatik kapasite geri kazanılmıştır (Zhao ve ark., 2011). Yine bu çalışmada, konneksin-43 cDNA'sının akciğer dev karsinoma hücre hatlarına transfeksiyonundan sonra, tümör hücrelerindeki büyümenin gerilediği gösterilmiştir. Literatürdeki yapılan çalışmalarla FSTL1'in tümör büyümesinde etkili olduğu gösterilen bu yollar Şekil 2.5'te verilmiştir. Yapılan çalışmalarla, FSTL1 ekspresyon seviyesinin tümör hücre hatlarında hücre

proliferasyonu, metastazı, apoptozu üzerindeki etkilerinin sonuçları ise Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Literatürde FSTL1'e ilave olarak, tümör makrofaj aktivasyonunu etkileyen OPN ve HMGB1 proteinleri de ön plana çıkmaktadır.

Tablo 2.3 Tümör hücre hatlarında FSTL1'in ekspresyon artışının ya da azalışının sağlanmasının hücre proliferasyonu, metastazı, apoptozu üzerindeki etkilerinin sonuçları

Tümör Tipi	Artmış FSTL1 ekspresyonu	Azalmış FSTL1 ekspresyonu	Metastaz	Hücre Proliferasyonu	Apoptoz	Referans
PC-14 (insan akciğer adenokarsinom) ve H460 (insan küçük hücreli akciğer karsinom) hücre hatları	+		-	↓		(Sumitomo vd., 2000; Ni vd., 2018)
CL1-5 (insan akciğer adenokarsinomu) hücre hattı	+			↓		(Chiou vd., 2017)
NCI-H460 (insan büyük hücreli akciğer karsinom) hücre hattı		siRNA blokajı ile ekspresyonu azalmış			↑	(Bae vd., 2016)
A549 (insan akciğer adenokarsinom) hücre hattı		siRNA blokajı ile ekspresyonu azalmış			↑	(Bae vd., 2016)
Akciğer dev karsinoma hücre hattı	+		-			(Zhao vd., 2011)
Ovca420 (insan over seröz adenokarsinom) ve ANC3CA (insan endometrium adenokarsinom) hücre hatları	+		-	↓	↑	(Chan vd., 2009)
HONE1 ve HNE1 (insan nazofarengeyal adenokarsinom) hücre hatları	+		-	↓		(Zhou vd., 2016)
İnsan melanoma hücre hatları		siRNA blokajı ile ekspresyonu azalmış	(Kemik metastazı bloklanyor)	↓		(Kudo-Saito vd., 2013)
F10-snail+ hücreleri implante edilen farelerin subkutan tümörleri		siRNA blokajı ile ekspresyonu azalmış	(Kemik metastazı bloklanyor)	↓		(Kudo-Saito vd., 2013)
CL1-0 (insan akciğer adenokarsinom) hücre hattı		+		↑		(Chiou vd., 2017)
MDA-MB-231-BR (insan meme kanseri beyine spesifik metastatik) hücre hattı	+		+	↑		(An vd., 2017)
786-O (berrak renal hücreli karsinom) hücre hattı ve MDA-MB-231 (insan meme kanseri) hücre hattı		+		↑		(An vd., 2017; Liu vd., 2018)
Huh7 (insan hepataselüler karsinom) hücre hattı	+			↑	↓	(Yang vd., 2017)
SCC12 (deri skuamöz hücreli karsinom) hücre hattı		nude fareye FSTL1 enjeksiyonu		↑		(Sundaram vd., 2017)
KYSE-150 (özofagus yassı epitel hücreli karsinom) hücre hattı	+		+	↑		(Lau vd., 2017)

2.7. Osteopontin

Osteopontin (OPN), Secreted Phosphoprotein 1 (SPP1) geninden kodlanan fosforile olarak salgılanan ve ilk olarak kemikte tanımlanmış proteindir. Daha sonra OPN'nin makrofajlar, fibroblastlar, lenfositler, endotel, düz kas ve epitel hücreleri tarafından da eksprese edildiği gözlenmiştir. Bu bulgulardan sonra aktive edilmiş T hücreleri ve transforme edilmiş hücre hatları tarafından üretilen sitokin (Eta-1) olarak da tanımlanmıştır (Patarca ve ark., 1993; Sodek ve ark., 2000; Denhardt David T ve ark., 2001). OPN, makrofajların göçüne neden olup diğer yandan reaktif oksijen türlerinin üretimini bastırmakta ve böylelikle B hücrelerinden immünoglobulin üretimini daha fazla uyarmaktadır (Rittling, 2011).

OPN klasik olarak bir ekstraselüler sitokin olarak sınıflandırılmıştır. Ancak, çeşitli post-transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalar sonucunda farklı OPN varyantları oluşmaktadır. Bunlar arasında salgılanan OPN (sOPN) ve intraselüler OPN (iOPN) izoformları bulunmaktadır (Gimba ve Tilli, 2013; Kamalabadi-Farahani ve ark., 2022). En uzun izoform olan sOPN, ekzon 2'ye karşılık gelen N-terminal sinyal peptid (SP) dizisini içerir. Bu SP dizisi, proteinin salgı keseciklerine yönlendirilmesine ve sitokin salgılanmasına olanak tanır. iOPN izoformu ise daha kısadır ve sOPN'nin N-terminal SP'sini içermez. iOPN, alternatif bir başlangıç bölgesinden non-AUG (başlangıç kodonu) ile translasyon sonucunda üretilir. Bu mekanizma, genellikle iOPN'nin sitoplazmada bulunmasını sağlar (Shinohara ve ark., 2008; Cantor ve Shinohara, 2009).

iOPN'nin perinükleer ve perimembranöz bir dağılım sergilediği ve bu dağılım OPN yamalarının sitoplazmik hücre yüzeyinde yoğunlaştığı bölgeleri içerdiği görülmüştür (Zohar ve ark., 2000). Ayrıca, iOPN'nin göç eden fibroblastlarda ezrin, radixin ve moesin gibi aktin bağlayıcı proteinlerin kompleksini içeren ve CD44 ile birlikte yerleşik olduğu da gösterilmiştir (Zohar ve ark., 2000). Aktive olmuş makrofajlar, göç eden osteoklastlar ve metastatik hücrelerde de iOPN ve CD44'nin birlikte lokalize olduğu ve bu hücrelerin migrasyon özellikleri ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (Zohar ve ark., 2000; Zhu ve ark., 2004). iOPN'nin, fare periton makrofajlarında CD44 bağımlı kemotaksisi de düzenleyebildiği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2004).

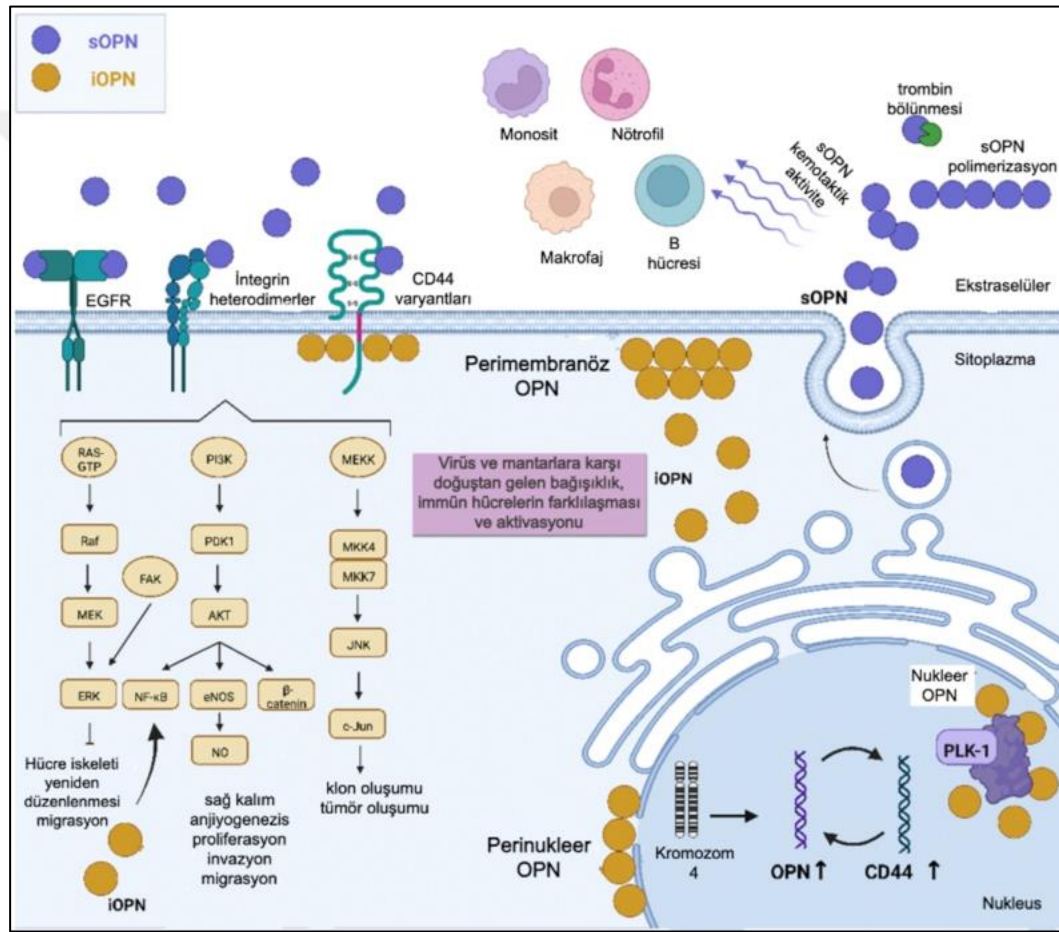
Junaid ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, iOPN'nin embriyonik böbrek 293 hücre hatlarında nükleer lokalizasyonunu gözlemlemiştir (Junaid ve ark., 2007). Aynı çalışmada, OPN'nin hücre bölünmesi sırasında kromatin kondensasyonu ile ilişkili olduğu mitoz düzenleyicisi polo-benzeri kinaz-1 (Plk-1) ile örtüşen bir alt hücresel dağılım sergilediği gösterilmiştir (Junaid ve ark., 2007).

iOPN immün yanıtta fonksiyonunu belirli yollar üzerinden gerçekleştirmektedir:

1. İntegrinler aracılığıyla NF- κ B yolağını aktive ederek inflamatuvar sitokinlerin gen ekspresyonunu regüle eder (Scatena ve ark., 1998).

2. Hücre içinde OPN, membranın sitoplazmik yüzeyinde MyD88 ve TLR9 kompleksiyle birlikte lokalizedir. Bu birliktelik, transkripsiyon faktörü IRF7'nin nükleer translokasyonunu aktive ederek güçlü IFN- α üretimini indükler (Shinohara ve ark., 2006).

3. CD44 aracılı OPN sinyali, PI3K / Akt yolunu aktive ederek hücre sağkalımını artırır (Lin Y. H. ve Yang-Yen, 2001). Bunun nedenini araştırmak için genetik profillemeye yapıldığında OPN'nin PI3K/Akt sinyal yolağının alt efektörü olduğu bulunmuştur (Packer ve ark., 2006).



Şekil 2.6. Kanser hücrelerinde osteopontin rolü ve mekanizmaları (Bastos ve ark., 2023) makalesinden pixlr.com kullanılarak modifiye edilmiştir.

sOPN, çeşitli kanser modellerinde çalışıldığında çeşitli sinyal yollarını indüklediği bildirilmiştir. Örneğin melanom kanser modelinde sOPN $\alpha\beta3$ 'e bağlanarak MEK1 bağımlı JNK1 fosforilasyonunu indüklerken (Rangaswami ve Kundu, 2007), gliomalarda ise OPN'nin doğrudan anjiyogenezi $\alpha\beta3$ /PI3K/AKT/eNOS/NO sinyal

yolakları aracılığıyla uyardığı ve gliomalarda anjiyogenezi artırarak tümörogeniziste önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Wang Yingyi ve ark., 2011b; Lund ve ark., 2013).

sOPN, IL-1 ile aktive olmuş insan monositlerine bağlanarak bu monositlerin kemotaksisine yol açarken dinlenme durumundaki T hücreleri, NK hücreleri veya B hücrelerine bağlanmazlar (Schack ve ark., 2009). sOPN, immün regülasyondaki rolünü integrin reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir. Ayrıca, monositlerin hücre yüzeyinde yüksek oranda ifade edilen bir $\alpha X\beta 2$ integrini (CD11c/CD18) OPN reseptörü olarak tanımlanmıştır. Bu da OPN'nin doğal immün fonksiyonunun önemli bir mekanizmasını açıklamaktadır (Schack ve ark., 2009).

sOPN tarafından indüklenen sinyal yolakları ve bunların ilgili reseptör bağlanmalarıyla ilişkili olarak, hem sOPN hem de iOPN bazı deneysel modellerde önemli roller oynamaktadır (Bastos ve ark., 2023). Bu mekanizmalar, sOPN ve varyantlarının özgül lokalizasyonları ile Şekil 2.6.'da özetlenmiştir.

İmmün yanıt dışında OPN; hücre adezyonu, yara iyileşmesi, kemik rezorpsiyonu, anjiyogenez ve doku yeniden modellenmesi dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte yer alır (Ahmed ve ark., 2011; Bandopadhyay ve ark., 2014). OPN, yapısal ve fonksiyonel işlevselliğini proteolitik kesimle kazanır. Wnt/ β katenin, Hedgehog, NF- κ B, G-protein aracılı yollar, reseptör tirozin veya östrojen sinyal yolakları gibi onkojenik ve tümör destekleyici yollarla OPN aktive olabilmektedir (Shi ve Wang, 2017). OPN, akciğer kanserinin ortaya çıkması, rekürrensisi ve metastazında önemli rol alırken (Wang X. M. ve ark., 2013), Rat1 fibroblastlarında siRNA aracılı down regüle edildiğinde malignite potansiyeli azalmıştır (Gardner ve ark., 1994). OPN transfeksiyonu malign fenotipi artırabilirken (Denhardt D. T. ve Guo, 1993), ksenograft akciğer kanseri modelinde OPN'ye spesifik siRNA uygulanması sonucunda hücre büyümesi inhibe olmuştur (Cho W. Y. ve ark., 2015).

Metastatik kanserli hastaların dolaşımında metastaz gelişimi sırasında OPN'nin ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir (Denhardt D. T. ve ark., 2003; Lin Q. ve ark., 2015b). Urquidi ve arkadaşları yaptığı çalışmada, meme kanseri hücrelerinde

sadece akciğer metastazı geliştirme kapasitesine sahip hücrelerde OPN'nin yüksek ekspresyonu gösterilmiştir (Urquidi ve ark., 2002)

OPN metastatik rolünü çoklu integrinler ve CD44 yoluyla sinerjik olarak EGFR ve HGF reseptörü Met üzerinden tümör hücresi migrasyonunu indükleyerek gerçekleştirmektedir (Tuck ve ark., 2000; Tuck ve ark., 2003). Bundan başka OPN'nin, akciğer kanseri hücrelerinde FAK/PI3K/Akt yoluyla ROCK sinyalini tetikleyebildiği, daha sonra hücrelerin lamellipodia oluşturmasını ve inaktive edici kofilin yoluyla da invazyonu indükleyebildiği görülmüştür (Kang C. G. ve ark., 2015). Osteopontin geninin ekspresyonun baskılanması veya osteopontinin bağlandığı $\alpha\beta 3$ integrin CD44'ün bloke edilmesi özellikle kanser metastazı için tedavi stratejileri arasında yer almaktadır (Rao G. ve ark., 2013; Pietras ve ark., 2014; Zhang H. ve ark., 2014a). Jean Chiou ve ark. FSTL1'in osteopontine bağlanarak $\alpha\beta 3$ integrin CD44 sinyal yolağını bloke ettiği ve aktin iskelet düzenlemesinin ortadan kalkmasıyla akciğer adenokarsinomlarında metastazın ilerlemesini engellediğini bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, akciğer kanseri hastalarında osteopontin ekspresyonun yükselmesine karşılık, FSTL1 ekspresyonunun azalmasının birlikte görülmesini, kötü prognoz ile ilişkilendirmişlerdir (Chiou ve ark., 2019).

2.8. High Mobility Group Box1

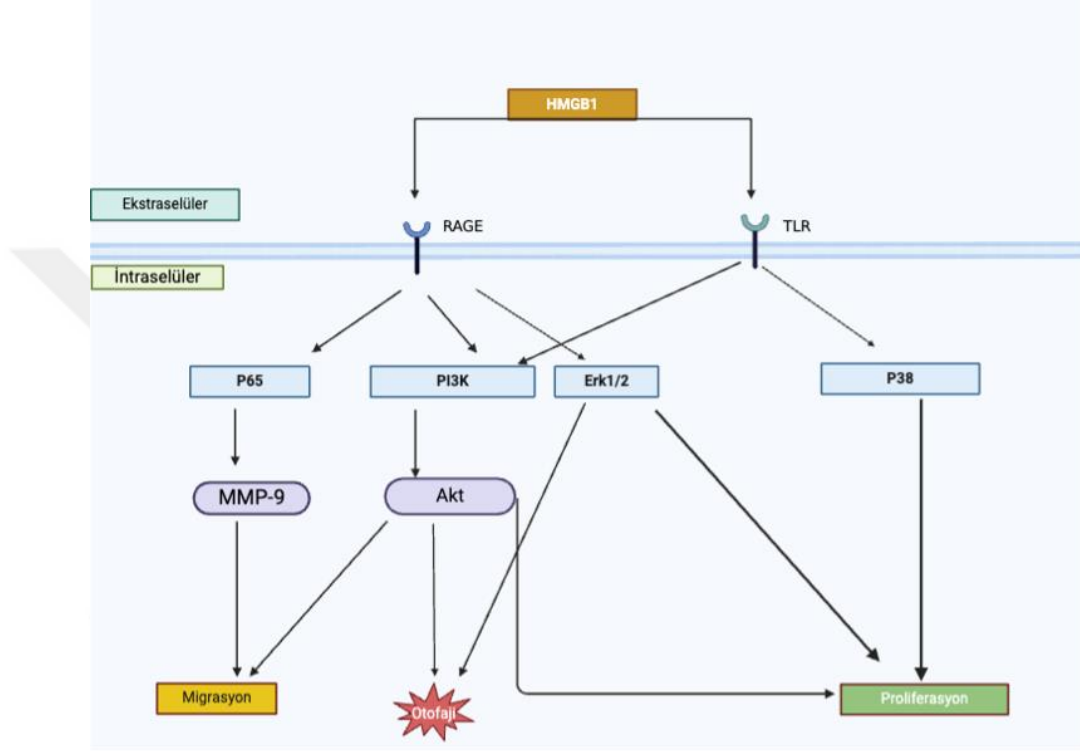
Jel elektroforezi sırasında hızlı göçü nedeniyle High Mobility Grup Box-1 olarak adlandırılan HMGB1 proteini, histon olmayan kromozomal proteindir. HMGB1; transkripsiyon, DNA onarımı, V(D)J rekombinasyonu gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Czura ve ark., 2001). HMGB1 nüklear rolünün yanı sıra inflamasyon, hücre farklılaşması, hücre migrasyonu ve tümör metastazı sırasında hücre dışı sinyal molekülü olarak da rol alır. HMGB1, nekrotik hücrelerden pasif olarak salınırken inflamatuvar hücreler tarafından aktif olarak salgılanmaktadır (Bianchi ve ark., 2017). Bu koşullar altında, HMGB1'in sitokin gibi davranarak inflamasyona aracılık ettiği düşünülmüştür (Gdynia ve ark., 2010; Terrando ve ark., 2010). Receptor for advanced glycation end products reseptörü (RAGE), Toll-like reseptörler (TLR)'den TLR-2, TLR-4, TLR- 9'a bağlanarak NF-kB yolağını aktive etmek suretiyle inflamasyon yanıtı oluşturmaktadır (Nogueira-Machado ve ark., 2011; Ibrahim ve ark., 2013).

Hepatoselüler karsinom, osteosarkom, nazofarengiyal karsinom, mide kanseri, meme kanseri, mezotelyoma gibi pek çok malignant tümörlerde HMGB1'in artmış ekspresyonu; tümör proliferasyonu, invazyon, metastazın ilerlemesi ve kötü prognoz gibi klinik parametrelerle ilişkilendirilmiştir (Wu D. ve ark., 2008; Tabata ve ark., 2013; Meng ve ark., 2014; Zhang J. ve ark., 2014b; Zhang L. ve ark., 2014c; Sun S. ve ark., 2015). HMGB1'in insan solunum yolu epitel hücrelerinde RAGE ve PI3K/AKT/GSK3 β / β -katenin sinyal yolağı üzerinden epitelden mezenkimal forma geçişi özofagus yassı epitel hücreli karsinom dokularında indükleyebileceği bildirilmiştir (Chen Y.-C. ve ark., 2016).

İnsan glioma dokularında, rat C6 glioma ve murine Lewis akciğer karsinom hücre hatlarında, HMGB1'in tümör büyümesinde önemli rol oynayan JAK/STAT, AKT, MAPK ve NF-kB içeren sinyal yollarını aktive ettiği bildirilmiştir (Taguchi ve ark., 2000; Kang R. ve ark., 2013; Wang X. J. ve ark., 2015). HMGB1'in biyolojik işlevleri özet olarak şekil 2.7.'de verilmiştir.

Son zamanlardaki bulgular, HMGB1'in akciğer kanserinin gelişiminde kritik, ancak çelişkili rol oynadığını göstermektedir (Wu X. J. ve ark., 2018). Örneklem büyüklüğü, tedavi yöntemleri ve analiz stratejilerindeki tutarsızlık nedeniyle, akciğer kanseri olan hastalarda HMGB1 ekspresyon seviyeleriyle ilgili tartışmalı sonuçlar gösterilmiştir. Birkaç çalışmada, KHDAK hastaların hem doku hem de serum örneklerinde sağlıklı bireylere ait örneklerle kıyasla istatistiksel olarak HMGB1 ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, HMGB1 ekspresyon seviyesiyle tümör büyüklüğü ve TNM evreleri arasında korelasyon da görülmüştür (Shang ve ark., 2009; Liu P.-L. ve ark., 2010; Sun K.-K. ve ark., 2013). Bu verilerden yola çıkarak HMGB1'in KHDAK progresyonunu değerlendirmek için potansiyel prognostik değere sahip kullanışlı bir klinik biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür. Ancak başka bir çalışmada KHDAK dokusundaki HMGB1 ekspresyonunun mRNA ve protein seviyesinde normal akciğer dokusuyla karşılaştırıldığında düşük olduğu, öte yandan evre III-IV hastalarında mRNA ekspresyonunun, evre I-II'ye kıyasla önemli ölçüde azalmış olduğu gösterilmiştir (Shen ve ark., 2009). İnsan akciğer kanseri A549 hücre hatlarında HMGB1'in susturulmasıyla β -aktin polimerizasyonu, hücre iskeleti oluşumu, kanser hücresi migrasyonu ve invazyonun arttığı in vitro olarak

gösterilirken, in vivo olarak da metastazın arttığı gözlenmiştir. Ardından HMGB1 knockdown edilmiş hücreleri rekombinant insan HMGB1 proteiniyle muamele ettiklerinde kanser hücresinde bahsedilen artışlar inhibe olmuştur (Zuo ve ark., 2014). Oysaki, Naumnik ve arkadaşların yaptıkları çalışmada, HMGB1 serum konsantrasyon seviyesinin akciğer kanserinin prognozunda hiçbir klinik önemi olmadığını belirtmişlerdir (Naumnik ve ark., 2009).



Şekil 2.7. HMGB1, hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve metastazını düzenler. (Şekil, Biorender web sitesinde tasarlanmıştır.)

Bu projede araştırılacak olan üç proteinin makrofaj polarizasyonundaki etkilerine yönelik literatürde bulunan çalışmalar, KHD AK kanser hücreleri ve çevre dokular tarafından bu proteinlerin ekspresyon seviyelerinin makrofaj polarizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayacağını düşündürmektedir. Örneğin, Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, ülseratif kolit hayvan modelinde FSTL1'in, fagositozu etkilemeden makrofajlara gelişmiş göç kabiliyeti sağladığı ve M1 polarizasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Li G. ve ark., 2020). Karaciğer fibrozunda ise, FSTL1 pozitif makrofajların arttığı, bu makrofajların M1 yönünde polarize olduğu belirlenmiştir (Rao J. ve ark., 2022).

Çalışmamızda incelenecek olan bir diğer protein olan ve aktivasyonu FSTL1 tarafından engellenen OPN'nin ise KHDAK hastalarında ve fare modelinde tümör-ilişkili makrofajlar tarafından salındığı ve insan monosit hücre hattı U937'nin OPN ile muamele edilmesinin M2 polarizasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Tan ve ark., 2022). Benzer bir şekilde akciğer fibrozunda da OPN'nin M2 polarizasyonunu indüklediği ve bu olayın altında JAK2/STAT3 yolak aktivasyonunun yattığı belirlenmiştir (Hou ve ark., 2021). OPN tarafından M2 polarizasyonunun desteklendiğini gösteren bir diğer veri ise kolit ilişkili tümör modelindeki miyofibroblastlarda elde edilmiştir (Yuan Q. ve ark., 2021).

İnceleyeceğimiz diğer protein HMGB1 ise, OPN'nin tersine M1 polarizasyonunda rol oynuyor görünmektedir (Tian ve ark., 2015; Schaper ve ark., 2016; He ve ark., 2021).

Bu tez çalışmasında, FSTL1, HMGB1 ve OPN proteinlerinin KHDAK tanılı olgulara ait tümör mikroçevresindeki makrofaj farklılaşması/polarizasyonu ile ilişkisini hem tek tek proteinler açısından hem de bu proteinlerin ko-ekspresyonu açısından değerlendirilerek hastalığın prognozu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi ve Numunelerin Toplanması

Bu projenin gerçekleştirilmesi için öncelikle, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.07.2020 tarihli toplantısında Karar No: KAEK-581 ile etik onayı alınmıştır.

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Antalya Eğitim Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi polikliniğine başvuran, araştırmaya katılmayı kabul ettiğine dair Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu imzalayan KHDAK tanısı konmuş 15 hasta dahil edilmiştir.

Tümörün çıkarılması amacıyla ameliyat edilen hastalara ait, fikse edilmemiş taze akciğer rezeksiyon materyallerinden tümör örnekleri alınarak frozen işlemi ile değerlendirilmiştir. İnvaziv tümör boyutu 1 cm üzerinde olan, öncesinde ince iğne biyopsi örneği ile KHDAK tanısı almış veya tanısı olmayan ancak frozen inceleme sırasında KHDAK tanısı verilebilen hastalara ait tümör ve tümöre komşu normal dokularıyla birlikte operasyon öncesi ve sonrası alınan periferik kan materyalleri çalışmaya dahil edilmiştir.

Tümör boyutunun küçük olması veya KHDAK tanısı dışında tanı alan vakalar çalışma dışı bırakılmıştır. Tümör boyutu 1 cm üzerinde olan ancak hastanın tedavisi sırasında onkoloji tarafından talep edilen ileri tetkikler nedeniyle yeterli dokusu kalmayan hastalar da çalışma dışı bırakılmıştır.

Hastaların ameliyatı esnasında çıkarılan primer tümör dokuları ve tümöre komşu normal akciğer dokuları IHC çalışma için formaline; RNA çalışması için ise "RNA Later solüsyonu" (Atlas Biyoteknoloji, katalog numarası: B09-01-01) içerisinde farklı tüplere alınmıştır. Hastalardan operasyon öncesi ve sonrası sarı kapaklı biyokimya tüplerine (BD Vacutainer) alınan 5ml periferik kan örnekleri ve doku örnekleri buz aküsüne konularak laboratuvar ortamına ulaştırılmıştır.

RNA çalışmasına hemen başlanılmadığında dokular bir gece +4°C’de muhafaza edildikten sonra RNA later uzaklaştırılarak tüpler alikotlanmış ve dokular -80°C’de RNA izolasyonu yapılana kadar saklanmıştır.

Operasyon öncesi ve sonrası sarı kapaklı biyokimya tüplerine alınan 5ml periferik kan örnekleri, 1 saat +4°C’de bekletildikten sonra 1000xg’de +4°C’de 20dk santrifüj edilerek ayrılan serumları tüplere alikotlanarak Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA) yapılana kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2. İmmünohistokimya Yöntemi

1. IHC deneyi için alınan doku materyalleri 1X PBS ile temizlendikten sonra %10 formalin fiksatifi içine alındıktan sonra parafine gömülmüştür. Döner mikrotom kullanılarak parafin bloklardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alınıp, immün boyama için kullanılan Superfrost Plus cam slaytlar üzerine fıkse edilerek preparatlar oluşturulmuştur.
2. Preparatlar, 60 °C’lik fırında (Nüve) 1 saat bekletilerek kesitteki dokuların lam üzerine iyi bir şekilde yapışması sağlanmıştır. Daha sonra, preparatlar 10 dakikalık sürelerle ksilol I ve ksilol II (Sigma katalog numarası:16446) aşamalarından geçirilmiştir. Azalan alkol (Merck, katalog numarası: 100986.2500) serilerinde (%100, %90, %80 ve %70’lik etanolde) 1x5 dakika preparatlar bekletilip ardından 5 dakika distile suda yıkanmıştır.
3. Antijenik bölgelerin açılması için preparatlar, Tris-EDTA (10 mM Tris(Merck, katalog numarası: 108387) ve 1 mM EDTA(Sigma, katalog numarası:10378-23-1)) içinde 800 Watt’a ayarlı mikro dalgada 2x5 dakika kaynatılmıştır. Sonrasında, soğuması için Tris-EDTA içinde 25 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu aşamada Osteopontin antikoru boyaması yapılacak preparatlar sitrik asit (Isolab 910.046.1000)içinde kaynatılmış olup çalışmada yer alan FSTL1, HMGB1, CCR7 ve CD206 antikorlarının boyamaları için preparatlar Tris-EDTA’da kaynatılmıştır.
4. Süre sonunda, preparattaki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle (Patolab, katalog numara: PEN-01) çizilip, 1X PBS içerisinde 3x5 dakika yıkama yapılmıştır. Daha sonra, metanol (Merck katalog numarası: 1060082500) içinde hazırlanacak olan %3’lük H₂O₂ (TEKKİM katalog numarası:TK080220) içinde 25 dakika oda ısısında bekletilerek, endojen peroksidaz aktivitesi bloklanmıştır. Bloklama sonrasında

preparatlar, 1X PBS içinde 3x5 dakika yıkanmıştır. Yıkama sonrası, preparatlar sekonder antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek için UV bloklama solüsyonunda (Thermo Fisher TA-125-PBQ), 5 dakika inkübe edilmiştir.

5. Bloklama sonrasında preparatlar, yıkama yapılmadan üzerlerindeki UV bloklama solüsyonu dökülüp, FSTL1, HMGB1, OPN, CD206 ve CCR7 primer antikorları (Tavşan anti-fare özellikteki FSTL1(invitrogen katalog numarası:PA5-31113, HMGB1(invitrogen katalog numarası: MA5-31967), OPN (invitrogen katalog numarası:PA5-13494), CD206 (Elabscience katalog numarası: E-AB-11247-120UL) ve CCR7 (Bioss USA katalog numarası:BS-1305R primer antikorları mikropipetle kesitlerin üzerine damlatılmıştır. Primer antikorlar, üreticinin önerdiği dilüsyonda antikor dilüsyon solüsyonu (Thermo Fisher katalog numarası: TA-125-ADQ) içinde hazırlanmıştır. Primer antikorlar; FSTL1 1/500, HMGB1 1/5000, OPN 1/100, CD206 1/500, CCR7 1/400 dilüsyon oranlarında optimize edilmiştir. Primer antikor damlatılan preparatlar, gece boyu +4°C inkübasyona bırakılmıştır. Her immünohistokimya boyamasında kesitlerden birisi negatif kontrol için kullanılmıştır. Bu nedenle, primer antikor yerine izotip antikor (Abcam katalog numarası: Ab 172730) damlatılmıştır.

6. Süre sonunda, preparatların üzerindeki primer antikor damlaları dökülüp 1X PBS'de 3x5 dakika yıkanmıştır. Daha sonra kesitlerin üzerine sekonder antikordan, üretici firmanın önerdiği dilüsyon oranında antikor dilüsyon solüsyonu içinde hazırlanıp damlatılmış ve preparatlar oda ısısında 1 saat inkübe edilmiştir. Keçiden üretilmiş, tavşana karşı ve biyotin ile işaretli bir sekonder antikor (Thermo scientific katalog numarası:TP-060-BN) kullanılmıştır. Preparatlar, sekonder antikor aşamasından sonra 1X PBS içinde 3x5 dakika yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kesitlerin üzerine streptavidin peroksidaz (HRP) (Thermo Fisher katalog numarası:TS-125-HR) damlatılıp 30 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1X PBS içinde 3x5 dakika yıkama yapılmıştır.

7. Yıkama sonrasında kesitlerin üzerine 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich katalog numarası: D4168) damlatılarak reaksiyon gelişimi ışık mikroskopunda kontrol edilmiştir. Reaksiyon gelişimi yeterli düzeye ulaştığında, preparatlar 1X PBS içine alınarak reaksiyon durdurulmuştur. Preparatlar, artan alkol serilerinde dehidrate edilip, ksilolden (Sigma, katalog numarası: 16446) geçirildikten

sonra Entellan (Merck, katalog numarası:1079600500) ile lamel (Menzel-glaser 24x50 mm) kullanılarak kapatılmıştır. Kapatılan preparatlar AxioCamMRc5 kamerası ile bağlanmış Zeiss Scope.A1 Axio biology mikroskobu altında bakılmıştır. Mikrograflar 200x ve 400x büyütmede çekilmiştir. FSTL1, HMGB1, OPN, CD206, CCR7 proteinlerinin bağlı immün boyama yoğunluğu ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

8. Kapatılan preparatlar preparat saklama kutusunda +4°C buzdolabında saklanmıştır.

3.3. RNA İzolasyonu

Thermo scientific GeneJet RNA Purification kit (REFK0731) kullanılarak hasta dokularından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Ön hazırlıklar

1. Lizis tampon hazırlanması: 1ml Lizis tamponu ependorf tüpe alınarak içine 20ul β -merkaptetanol (Merck katalog numarası:60-24-2) konulmuştur. RNA izolasyonuna başlamadan önce her bir numune için taze olacak şekilde hazırlanmıştır.
2. Proteinaz K solüsyonun hazırlanması: 590ul Tris-EDTA tamponu (10mM Tris-HCL pH 8.0 0,1mM EDTA) ile kit içeriğinde olan proteinaz K'dan 10 μ l ependorf tüpe alınarak solüsyon hazırlanmıştır.

Deney aşaması

1. Dokular 30mg olacak şekilde tartılarak üzerine 300ul Lizis tamponu eklenmiştir. Rotor-stator homojenizatör (Pro Scientific PRO200) ile parçalanarak süspanse hale getirilen dokular ependorf tüpe aktarılmıştır.
2. Süspansiyon haline gelen doku örneklerine 600 μ l proteinaz K solüsyonu eklenerek vortekslenip 15-25°C'de 10dk inkübasyona bırakılmıştır.
3. Ardından tüp 12.500xg'de 10dk santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır.

5. Süpernatant üzerine 450 µl %96-100 etanol eklenerek pipetaj yapılarak lizat oluşturulmuştur.
6. 700 µl lizat kolonlara aktararak 12.500xg'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne akan uzaklaştırılarak kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Bu aşama lizat kolona transfer olana kadar tekrar edilmiştir.
7. Kolona 700 µl yıkama tamponu 1 eklenip 12.500xg'de 1dk santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
8. Kolona 600 µl yıkama tamponu 2 eklenip 12.500xg'de 1dk santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir tüpe aktarılmıştır.
9. Kolona 250 µl yıkama tamponu 2 eklenerek 12.500xg'de 2dk santrifüj edilip kolon 1.5ml RNaz-içermeyen tüpe alınmıştır.
10. Üzerine 100 µl nukleaz içermeyen su eklenerek 12.500xg'de 1dk santrifüj edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.
11. Kolon uzaklaştırıldıktan sonra, RNA konsantrasyonları Quawell/Q9000B cihazında ölçülerek kullanana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.4. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Applied Biosystems™ High Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (katalog numarası:4368814) cDNA reaksiyonu hazırlanmıştır.

Kit içeriğine göre her bir örnek için 2X RT master miks hazırlama aşağıdaki tabloda verilen hacimlere göre hazırlanmıştır.

Kullanılan kimyasal	X(µl)
10X Tampon	2
25X dNTPkarışımı (100mM)	0,8
10X Random primer	2
Reverz Transkriptaz	1
RNaz İnhibitör	1
Nukleaz içermeyen H2O	3,2
RNA	10
Toplam hacim	20

Öncelikle; kit içerikleri buz üzerine alınıp, 2X Master Mix hazırlanması buz üzerinde yapılmıştır. 2X Master Mix yavaşça pipetajlanarak ilgili tüplere dağıtılmış ve bu

tüplerin üzerlerine ilgili örneğe ait RNA'dan 10 µl konulmuştur. Hazırlanan bu tüpler pipetaj yapılarak Blue Ray cihazına yerleştirilmiştir. Cihazda reaksiyon koşulları; 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve +4°C'de ∞ olacak şekilde ayarlanmıştır.

cDNA örneklerin konsantrasyonu ve saflıkları Quawell/Q9000B cihazında ölçülerek belirlenmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları için cDNA konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde sulandırılmıştır. cDNA örnekleri hemen çalışılacaksa +4°C'de, uzun süre sonra çalışılacaksa -20°C'de saklanmıştır.

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

Çalışma kapsamında *FSTL1*, *HMGB1* ve *OPN* genlerinin ekspresyon tayini için kullanılan hedef primerler ve kontrol primerleri (GAPDH) (ProbeSynthesis) aşağıda verilmiştir. Her bir primer üretici firmanın önerisi doğrultusunda 100µM konsantrasyon olacak şekilde sulandırılıp kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Amplikon uzunluğu(baz çifti)	Referans(PMID numarası)
FSTL1	5'-CCCAGTTGTTTGTCTATCAGTCC-3'	5'-TGAGTTGCTGCCTTTAGAGAAC-3'	110	35477822
OPN	5'CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG3'	5'GCACCATTCACCTCGCTTTC3'	821	33052224
HMGB1	5'ATATGGCAAAGCGGACAAG3'	5'AGGCCAGGATGTTCTCCTTT3'	669	24481712
GAPDH	5'CAACGAATTTGGCTACAGCA3'	5'AGGGGTCTACAT GGCAACTG3'	195	24481712

AMPIGENE® qPCR Green Mix Hi-ROX ticari kiti (katalog numarası: ENZ-NUC104-1000) kullanarak *FSTL1*, *HMGB1*, *OPN* ve *GAPDH* genlerine ait PCR koşulları şu şekilde hazırlanmıştır:

Malzeme adı	X(µl)
qPCR Yeşil boya karışımı Hi-ROX	10
İleri primer(10µM)	0,8
Geri primer(10µM)	0,8
RNaz içermeyen H2O	7,4
cDNA(100ng/ml)	1
Toplam hacim	20

Hazırlanan PCR örnekleri MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0.1mL) (katalog numarası:4346907) kuyucuklarına yüklenerek üzeri Applied Biosystems Optical Adhesive Covers (katalog numarası: 4360954) ile kapatılıp ardından plate'i kısa spin yaptırdıktan sonra, Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real Time PCR cihazına yerleştirip 95°C'de 15dk başlangıç denatürasyonunun ardından 40 döngü olacak şekilde 95°C'de 20 sn, 55°C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn koşulunda gen ekspresyon tayinleri eş zamanlı olarak görüntülenmiştir.

Gen ekspresyon tayini yapılacak her bir örnek için negatif kontrol ve kontrol gen reaksiyonları da hedef genlerle birlikte kurularak kuyucuklara yüklenmiştir. qRT-PCR deneyi her örnek için 3 kez tekrarlanmıştır.

3.6. İnsan FSTL1 Protein Ekspresyonun ELISA Yöntemiyle Tayini

İnsan FSTL1 ELISA kit (Elabscience, katalog no: E-EL_H0173) kullanılarak deney gerçekleştirildi.

İnsan FSTL1 ELISA kit protokolü

Gereken malzeme ve solüsyonların hazırlanması:

1. Tüm deney malzemeleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Yıkama solüsyonu hazırlandı. Bunun için 30 ml konsantre yıkama tamponuna 720ml distile su konularak toplam 750 ml hacimde yıkama solüsyonu elde edildi.
3. Referans standart 10,000xg'de 1dk santrifüj edildi. Standart solüsyon 1ml referans standart&örnek dilüsyon solüsyonu içinde çözüldü ve birkaç kez yavaşça karıştırılarak 10 dk boyunca bekletildi. Tamamen çözüldükten sonra ise pipet yardımıyla karıştırıldı. Bu çalışma solüsyonu 20 ng/ml olacak şekilde alikotlandı.
4. Dilüsyon metodunda 7 tane ependorf tüpü alınarak hepsine 500 µl standart&örnek dilüsyon solüsyonundan eklendi. İlk tüpe 500 µl referans standartından konuldu ve 10ng/ml çalışma solüsyonu elde edildi. İkinci tüpe birinci tüpten 500 µl aktararak vortekslendi ve 5 ng/ml çalışma solüsyonu elde edildi. En son 6. tüpte 1ml karışım kalacak şekilde bu dilüsyonlar yapıldı.
5. 100X konsantrasyona sahip biyotinlenmiş tespit antikoru 800xg'de 1dk santrifüj edildi. 1X konsantrasyona sahip biyotinlenmiş tespit antikoru çalışma solüsyonu elde edebilmek için için; 100X konsantrasyonda biyotinlenmiş tespit

antikorundan 100 µl alarak üzerine biyotinlenmiş tespit antikor dilüsyon solüsyonundan 9,9 ml eklenerek karışım elde edildi. Deneyden önce gerekli miktarı hesaplanarak kuyu başına 100 µL olacak şekilde taze hazırlandı.

6. 100X Konsantre Horseadish Peroksidaz (HRP) konjuge çalışma solüsyonu 800xg'de 1dk santrifüj edildi. 1X konsantre HRP konjuge solüsyonu hazırlanması için; 100X Konsantre HRP konjuge çalışma solüsyonundan 100 µl alarak üzerine HRP konjuge dilüsyon solüsyonundan 9,9 ml eklenerek karışım elde edildi. Deneyden önce gerekli miktarı hesaplanarak kuyu başına 100 µL olacak şekilde taze hazırlandı.

ELISA protokolü:

1. Kuyucuklara 100 µl serum, standartlar ve kör numuneler eklendi ve 37°C'de 90dk inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra sıvı uzaklaştırıldı. Hemen biyotinlenmiş tespit antikor çalışma solüsyonundan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi ve 60dk'da 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon sonrasında sıvı uzaklaştırıldı ve plate 3 kez yıkandı.
4. Her bir kuyucuğa HRP konjuge çalışma solüsyonundan 100 µl eklendi. 37°C'de 30 dk inkübe edildi ardından kuyucuklar boşaltıldı ve plate 5 kez yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa substrat reagent'tan 90 µl eklendi karanlık ortam sağlanarak 37°C'de 15 dk inkübe edildi.
6. Kuyucuklara stop solüsyonundan 50 µl eklendi.
7. Spektrofotometre (Thermo Scientific Multiskan Go, REF:51119200) cihazında 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun optik yoğunluğu belirlendi.
8. Cihazın SkanIt 3.2 adlı yazılımında oluşan örnek absorbans değerleri elde edilmiştir. Standartların ve örneklerin iki kez deney tekrarı yapılmış; ortalama absorbans hesaplanmıştır. Excel'de oluşturulan doğrusal doğru denklemine göre örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.7. İnsan HMGB1 Protein Ekspresyonun ELISA Yöntemiyle Tayini

İnsan HMGB1 ELISA kit (Elabscience, katalog no: E-EL_H1554) kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir.

Standart alışma solüsyonlarını konsantrasyonları pg/ml olacak şekilde hazırlanarak FSTL1 kiti ile aynı protokol uygulanmıştır.

3.8. İnsan OPN Protein Ekspresyonun ELISA Yöntemiyle Tayini

İnsan OPN ELISA kit (Elabscience, katalog no: E-EL-H1347) kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir.

Standart alışma solüsyonlarının konsantrasyonları ng/ml olacak şekilde hazırlanarak FSTL1 kiti ile aynı protokol uygulanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Hastaların Demografik, Klinik ve Patolojik Bulguları

Toplam 15 KHDAK hastasının 2'si kadın 13'ü erkektir. En küçük yaş 24 ve en büyük yaş 85 olup yaş ortalaması±standart sapması 67,42±13,03 tespit edilmiştir. Histolojik olarak 8 tümör örneği adenokarsinom, 6 tümör örneği skuamöz ve 1 tümör örneği ise adenoskuamöz alt tipi tanısını almıştır. 6 örneğin tümör çapı 4 cm'den büyük, 9 örneğin ise 4 cm'den küçük olarak belirlenmiştir. Hastalardan tümör materyalini çıkarmak için 5 bireye wedge rezeksiyon, 9 bireye lobektomi ve 1 bireye segmentektomi işlemi uygulanmıştır. Tümör materyali; 3 bireyde sol lobdan 12 bireyde ise sağ lobdan çıkarılmıştır. Hastalara ait demografik, klinik ve patolojik bulgular Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1.'de verilen lenf nodu tutulumu "N" olarak belirtilmiştir. 13 hastada lenf nodu tutulumu gözlenmezken (N0), lenf nodu tutulumu N1(1 numaralı hasta) ve N2 (12 numaralı hasta) olan 2 hastada lenf nodu metastazı belirlenmiştir.

10 ve 15 numaralı hastalarda visseral plevra invazyonu görülmüştür. Ayrıca 15 numaralı hastada akciğer primer tümörünün kolon metastazı da saptanmıştır. Aynı hastanın metastazı M1 olarak gösterilirken, diğer hastalarda uzak organlara metastaz olmadığından M0 ile gösterilmiştir. Tüm hastalar içerisinde yalnızca 15 numaralı hasta daha önce 4 kez kemoterapi almış, diğer hastalar ise kemoterapi almamıştır.

Amerikan Ortak Kanseri Komitesi (AJCC) 8. TNM (tümör, lenf nodu ve metastaz) evreleme sistemine göre adenokarsinom ve skuamöz alt tipine sahip hastalardan; 4 hasta evreIA, 3 hasta evreIB, 4 hasta evreIIA, 2 hasta evreIIB, 1 hasta evreIIIA olduğu belirlenmiştir. Adenoskuamöz hastasının adenokarsinomu evreIA, skuamöz evreIB olarak değerlendirilmiştir.

Sigara içicilik durumuna bakıldığında 14 hastanın sigara içtiği ve 1 kadın hastanın hiç sigara içmediği bilinmektedir. Aile soygeçmişine bakıldığında; 1 numaralı hastanın erkek kardeşlerinin mide ve kolon kanserinden öldüğü, 4 numaralı hastanın kuzenlerinde kolon kanseri, çalışmamızın en genç hastası olan 7 numaralı bireyin

halasında larenks, dedesinde prostat, kuzenlerinde testis ve meme kanser geçmişi, 9 numaralı hastanın abisinde kanser geçmişi olduğu bilinmektedir.

Tablo 4.1. Hastalara ait demografik, klinik ve patolojik bulgular

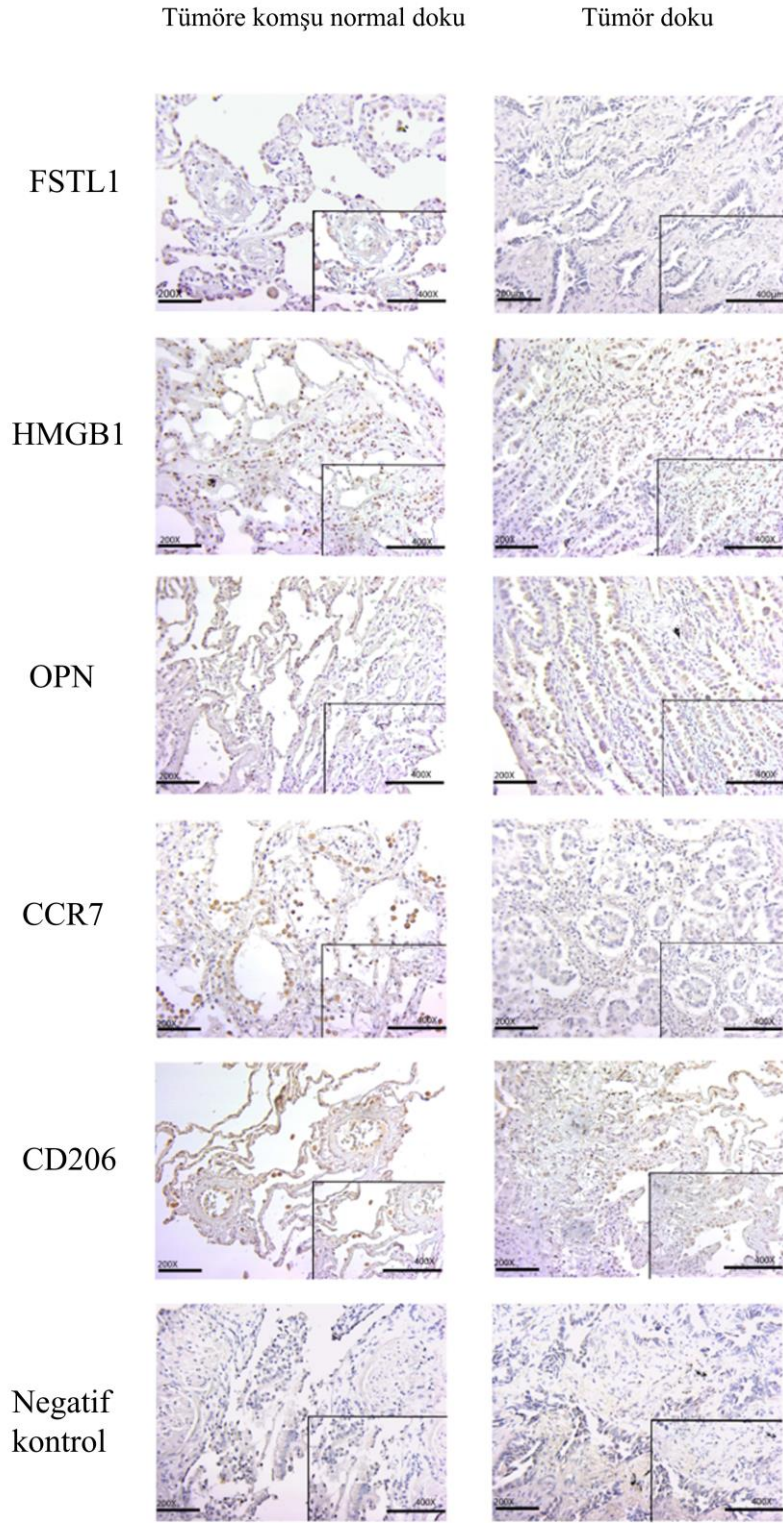
Hasta numarası	Cinsiyet	Yaş	Cerrahi işlem tipi	Tümör büyüklüğü (cm)	Tümör bölgesi (sağ lob/sol lob)	Histolojik özellik	Primer Tümör (T) (T1-2 / T3-4)	Lenf nodu tutulumu (N)(N0/N1-3)	Metastaz (M) (M0/M1)	Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) kanser evreleme sistemi(I-II/III-IV)	Sigara içiciliği	Ailede kanser öyküsü
1	Erkek	86	wedge rezeksiyon	5,5	sağ üst lob	Adenokarsinom	pT1c	N1	M0	Evre IIB	var	var(erkek kardeşlerde mide ve kolon kanseri)
2	Erkek	61	lobektomi	5,2	sağ üst lob	Adenokarsinom	pT3	N0	M0	Evre IIA	var	yok
3	Erkek	71	wedge rezeksiyon	1,8	sağ alt lob	Adenokarsinom	pT1b	N0	M0	Evre IB	var	yok
4	Erkek	70	lobektomi	4,75	sağ alt lob	Skumöz	pT2b	N0	M0	Evre IIA	var	var
5	Erkek	71	lobektomi	3,1	sağ üst lob	Skumöz	pT2a	N0	M0	Evre IB	var	yok
6	Kadın	66	lobektomi	5	sağ alt lob	Adenokarsinom	pT2b	N0	M0	Evre IIA	var	yok
7	Erkek	24	lobektomi	3	sağ alt lob	Adenokarsinom	pT1min	N0	M0	Evre IA	var	var(hala larenks, dede prostat, kuzeni testis, kuzeni meme kanseri)
8	Erkek	77	lobektomi	adenokarsinom tümör boyutu 2,5cm, skuamöz tümör boyutu 4cm	sol üst lob	Adenoskuamöz	Adenokarsinom pT1c, skuamöz pT2a	N0	M0	Adenokarsinom Evre IA, Skumöz Evre IB	var	yok
9	Erkek	64	wedge rezeksiyon	1,8	sol üst lob	Skumöz	pT1a	N0	M0	Evre IA	var	var(abi)
10	Erkek	76	segmentektomi	2	sol alt lob	Skumöz	pT3	N0	M0	Evre IIB	var	yok
11	Erkek	72	lobektomi	7,8	sağ üst lob	Adenokarsinom	pT4	N0	M0	Evre IIIA	var	yok
12	Kadın	68	lobektomi	5	sağ alt lob	Adenokarsinom	pT2b	N2	M0	Evre IIA	yok	yok
13	Erkek	71	lobektomi	1,8	sağ alt lob	Skumöz	pT1b	N0	M0	Evre IA	var	yok
14	Erkek	62	wedge rezeksiyon	1,8	sağ orta lob	Skumöz	pT1a	N0	M0	Evre IA	var	yok
15	Erkek	72	wedge rezeksiyon	2	sağ üst lob	Adenokarsinom	pT1b	N0	M1	Evre IB	var	yok

Yaş, cinsiyet, evreleme ile FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 protein ekspresyonları arasında ve *FSTL1*, *HMGB1*, *OPN* genlerinin mRNA ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Hastaların tümör büyüklüğü ile kanser evresi arasında beklenildiği gibi korelasyon vardır ($p=0.01$).

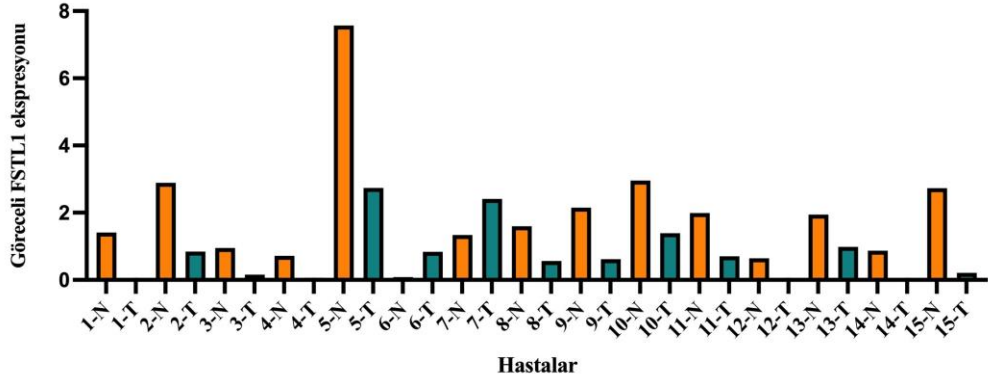
4.2. İmmünohistokimya Deneylerinin Analiz Sonuçları

Şekil 4.1.'de IHC yapılan tümöre komşu normal doku ve tümör dokusunun FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7, CD206 antikorları ile boyama ve negatif kontrole ait boyamaların mikroyafları görülmektedir.

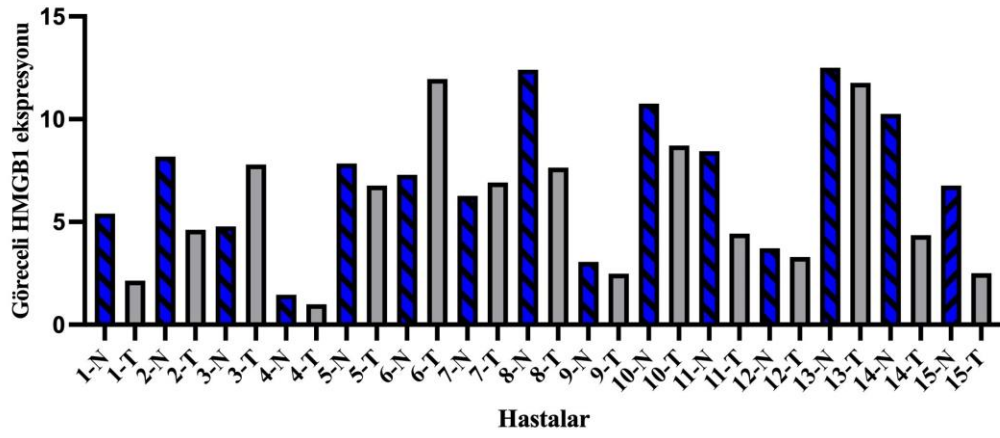
Her bir hastanın tümöre komşu normal doku ve tümör dokusundaki 200X'de çekilen fotoğrafların tümü ImageJ analiz yazılımında renk yoğunluğu ölçülerek FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7, OPN protein ekspresyonlarının göreceli ölçüm değerleri elde edilmiştir. Hastalara ait FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7, CD206 proteinlerin ölçüm değerleri sırasıyla şekil 4.2,4.3,4.4,4.5 ve son olarak şekil 4.6'da verilmiştir.



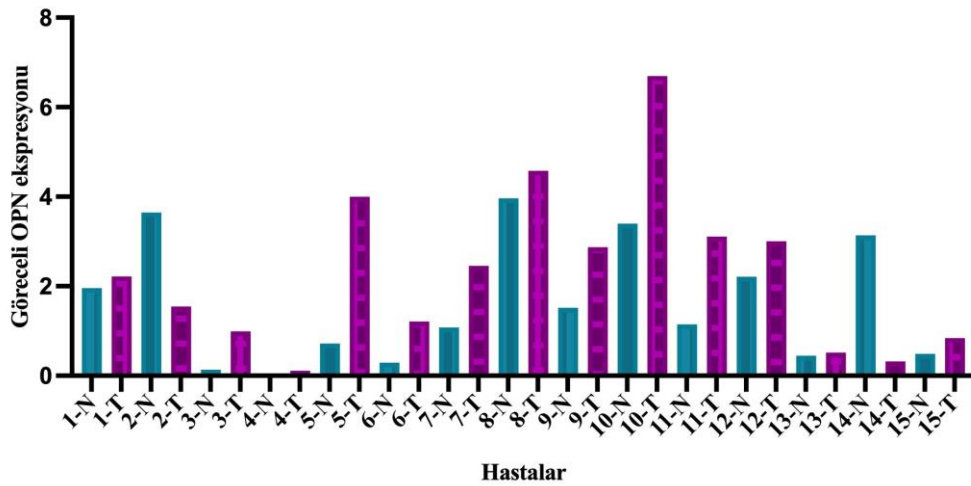
Şekil 4.1. IHC yapılan tümöre komşu ve tümör dokularında FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7, CD206 proteinlerin ekspresyonu ile negatif kontrol örneklerinin 200X ve 400X büyütmede çekilen mikrografları



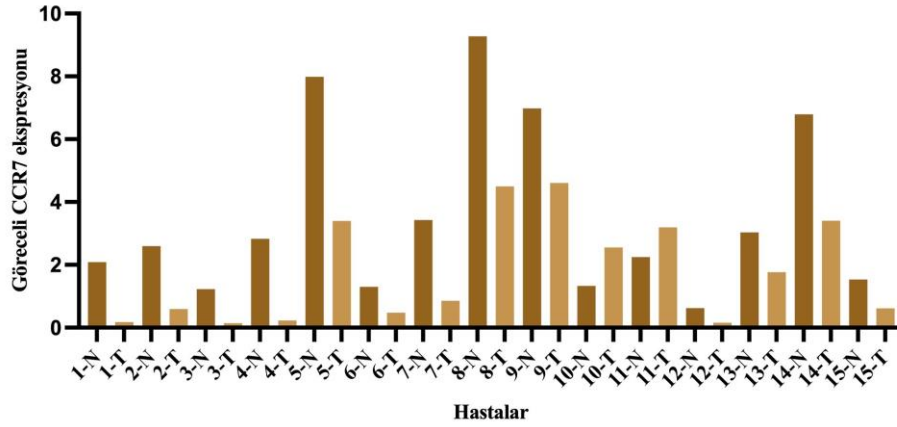
Şekil 4.2. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında FSTL1 protein ekspresyonu



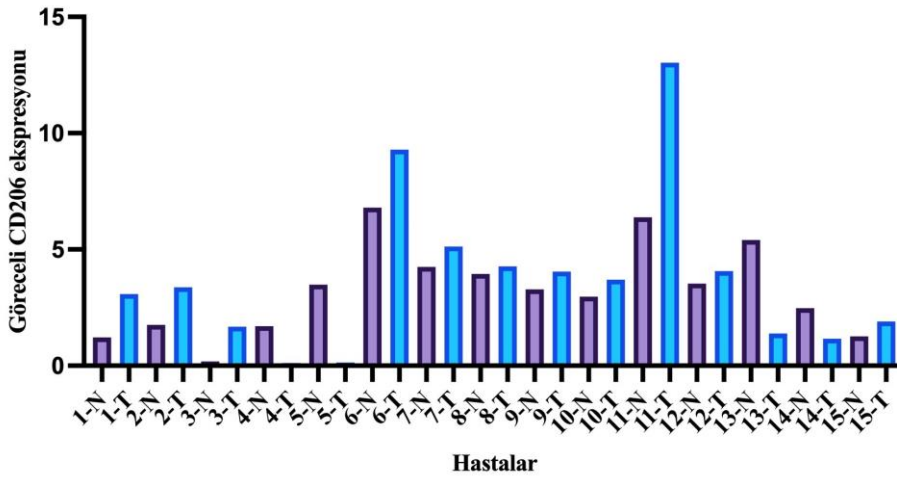
Şekil 4.3. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre Tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında HMGB1 protein ekspresyonu



Şekil 4.4. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında OPN protein ekspresyonu



Şekil 4.5. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında CCR7 protein ekspresyonu

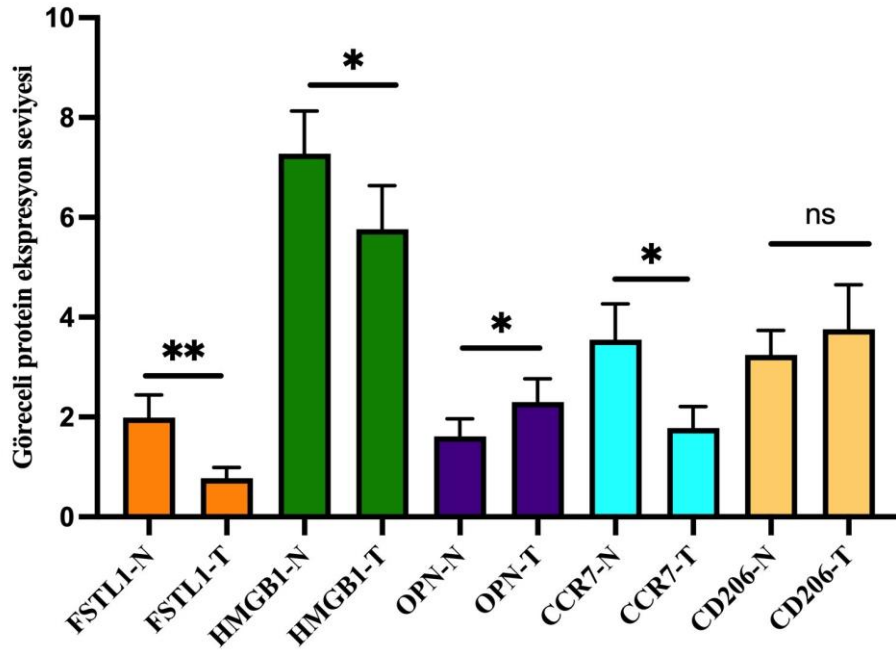


Şekil 4.6. Hastaların ImageJ yazılımında IHC analiz sonucuna göre tümöre komşu normal dokuda(N) ve tümör(T) dokularında CD206 protein ekspresyonu

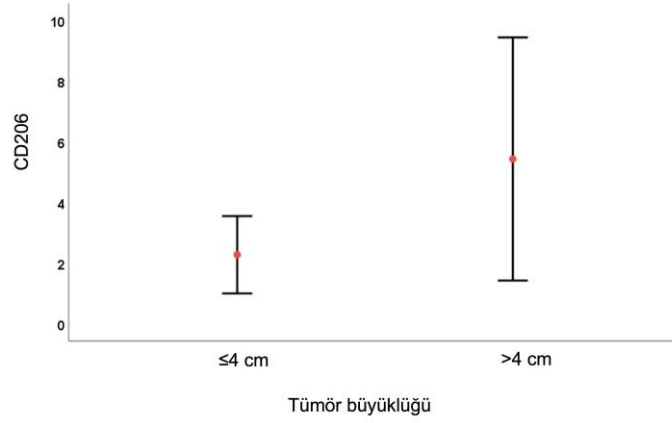
Tümöre komşu normal doku ve tümör dokularında incelediğimiz FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 göreceli protein ekspresyonlarının arasında bir fark olup olmadığı Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Tümöre komşu normal doku ve tümör dokularında FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 proteinlerin göreceli ekspresyonları Şekil 4.7’de verilmiştir. Tümöre komşu normal dokuda ve tümör dokularında FSTL1, OPN, CCR7 ve HMGB1 protein ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Tümöre komşu normal dokuda, tümör dokusuna kıyasla FSTL1, HMGB1 ve CCR7 ekspresyonu yüksek bulunurken, OPN ve CD206 ekspresyonunda düşüş gözlemlenmiştir. CD206 proteinin ise tümör ve tümöre komşu normal dokuda

göreceli ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,334$) ($p<0.05$).

FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 protein ekspresyonları arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı Spearman's rho testi yapılarak bakılmıştır. Tümör dokudaki FSTL1 ekspresyonu ile HMGB1 ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon bulunmuştur $p=0.017$ ($p<0.05$). FSTL1 ekspresyonu azalırken HMGB1 ekspresyonu da azalmıştır. FSTL1, HMGB1, OPN ve CCR7 protein ekspresyonları ile yaş, cinsiyet, tümör büyüklüğü, metastaz ve TNM evreleme arasında istatistiksel olarak korelasyon bulunmamıştır. Sadece tümör dokuda CD206 protein ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p=0.033$). CD206 ekspresyonu artarken tümör büyüklüğü de artmıştır. Tümör büyüklüğü ile tümör evreleme arasında beklendiği gibi pozitif korelasyon saptanmıştır ($p=0.008$). Tümör büyüklüğü artarken tümör evresi de ilerlemiştir. Ayrıca tümör dokusunda CD206 protein ekspresyonun, tümör büyüklüğü ≤ 4 cm ve >4 cm olan gruplarda şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Tümöre komşu normal dokuda ve tümör dokuda FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 proteinlerin total göreceli ekspresyonları. Elde edilen veriler, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. *($p<0.05$) ve **($p<0.01$) işaretleri olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. “ns” yazılı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p<0.05$). “N” tümöre komşu normal doku, “T” tümör doku kısaltması olarak verilmiştir.



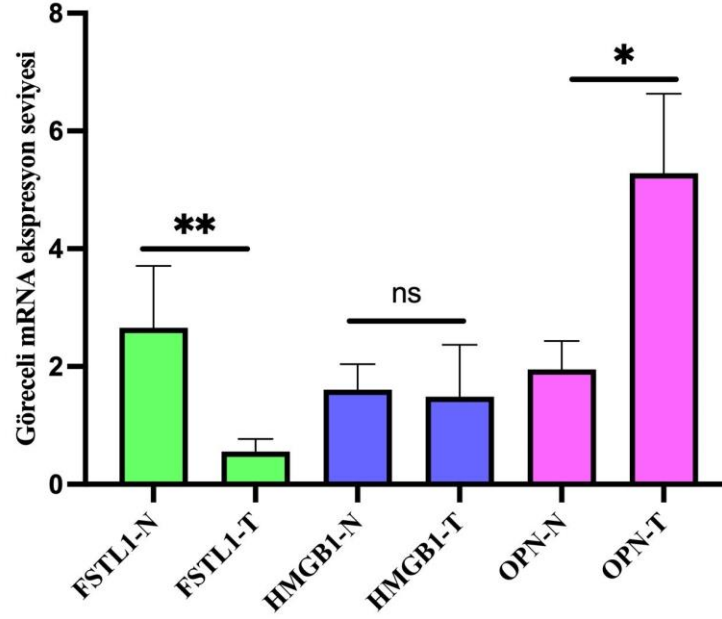
Şekil 4.8. CD206 protein ekspresyon seviyesinin, tümör büyüklüğü ≤ 4 cm ve >4 cm olan gruplarda gösterilmiştir.

4.3. qRT-PCR Deneyin Analizi Sonuçları

Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System cihazının yazılımında *FSTL1*, *HMGB1*, *OPN* gen ekspresyonları analiz edilip *GAPDH* kontrol geninin ekspresyonuna göre karşılaştırılması yapılmıştır. Genlerin ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre hesaplanmıştır. *FSTL1*, *HMGB1* ve *OPN* gen ekspresyon seviyeleri, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Tümöre komşu normal doku ve tümör dokuda *FSTL1* ve *OPN* gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken ($p < 0.01$ ve $p < 0.05$), *HMGB1* ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Tümöre komşu normal ve tümör dokularında *FSTL1*, *HMGB1* ve *OPN* genlerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Şekil 4.9’da verilmiştir.

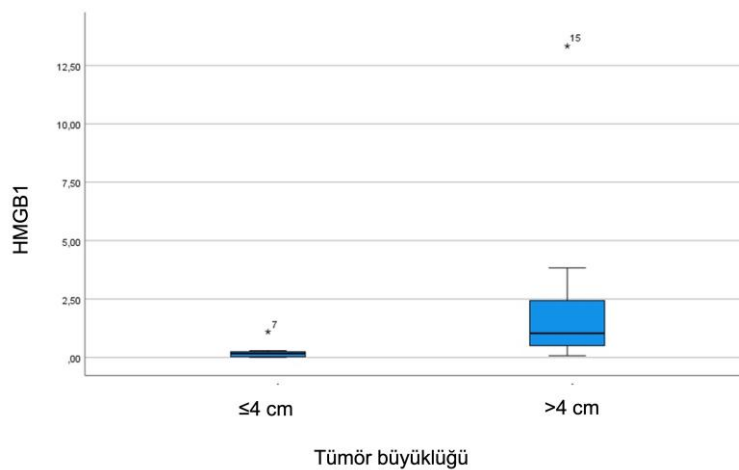
FSTL1, *HMGB1* ve *OPN* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığına Spearman’s rho testi yapılarak bakılmıştır. Hem tümöre komşu normal dokuda hem de tümör dokusunda *FSTL1* mRNA ekspresyonuyla *OPN* ekspresyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur (bulunan p değerleri sırasıyla: $p = 0.027$, $p = 0.035$).

Tümöre komşu normal dokuda *FSTL1* ile *HMGB1* ekspresyonu arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p = 0.006$). *FSTL1* ekspresyonu azalırken, *HMGB1* ekspresyonu azalmıştır.



Şekil 4.9. Tümöre komşu normal doku ve tümör dokuda *FSTL1*, *HMGB1* ve *OPN* genlerinin mRNA'ların göreceli ekspresyonları. Elde edilen veriler, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. * ($p<0.05$) ve **($p<0.01$) işaretli olan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. "ns" yazılı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. "N" Tümöre komşu normal doku, "T" tümör doku kısaltması olarak verilmiştir.

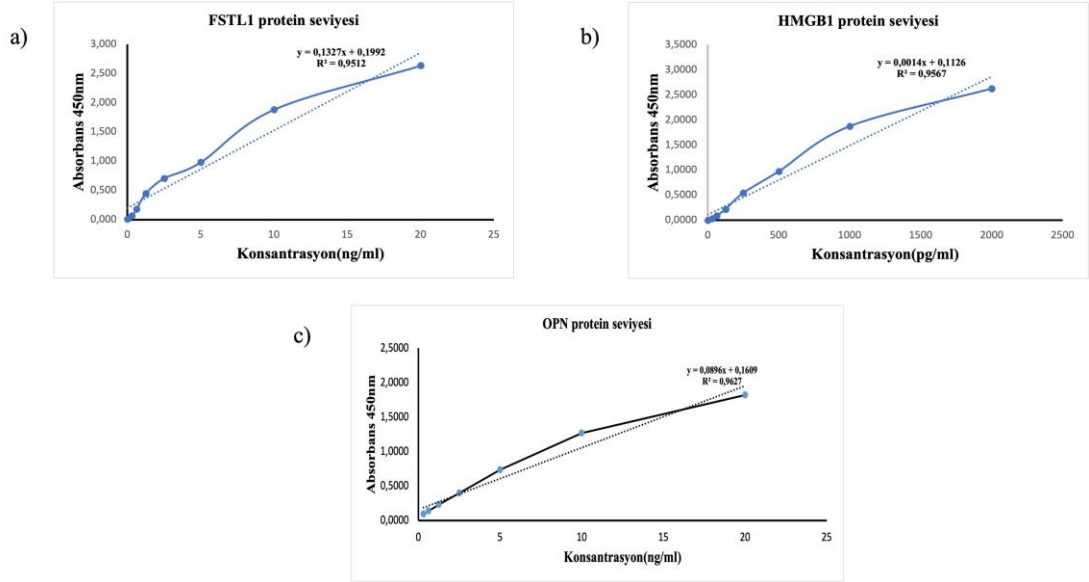
FSTL1, *HMGB1* ve *OPN* mRNA ekspresyonlarının yaş, cinsiyet, tümör büyüklüğü, TNM evreleme sistemi arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığına bakılmıştır. Tümör *HMGB1* mRNA ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında pozitif korelasyon bulunmuştur ($p=0.002$). Tümör dokusunda *HMGB1* mRNA ekspresyonunu, tümör büyüklüğü ≤ 4 cm ve >4 cm olan gruplarda şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Tümör dokusunda *HMGB1* geninin mRNA ekspresyon seviyesi, tümör büyüklüğü ≤ 4 cm ve >4 cm olan gruplarda gösterilmiştir.

4.4. ELISA Deneyinin Analiz Sonuçları

Şekil 4.11.'de verilen excel'de oluşturulan doğrusal denklemlerine göre örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.



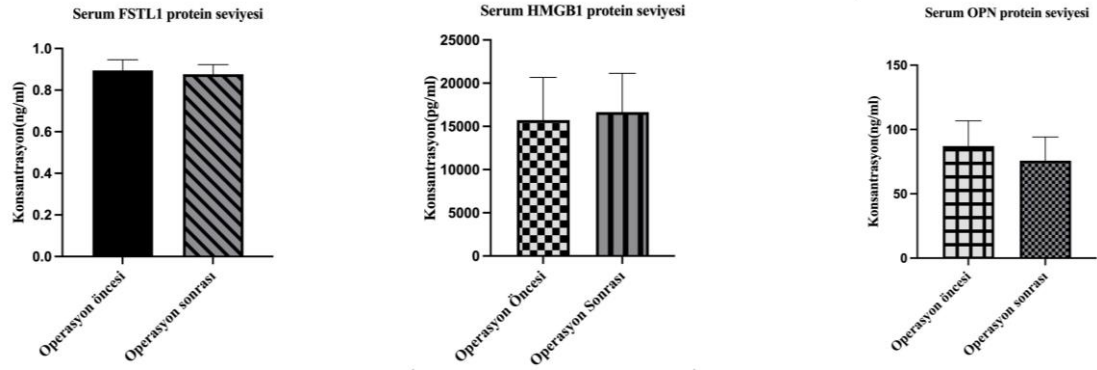
Şekil 4.11. FSTL1(a), HMGB1(b) ve OPN(c) proteinlerinin ELISA deney sonucunda excelde oluşturulan denklemleri

Serumda FSTL1 protein konsantrasyon ortalaması $\pm$ standart sapması operasyon öncesi 0.894 ± 0.198 ng/ml, operasyon sonrası 0.876 ± 0.179 ng/ml olarak bulunmuştur. En yüksek operasyon öncesi FSTL1 protein konsantrasyonu 1.487 ng/ml iken en düşük değer 0.749 ng/ml'dir. Operasyon sonrası en yüksek konsantrasyon 1.421 ng/ml, en düşük konsantrasyon 0.752ng/ml olarak bulunmuştur.

Serumda HMGB1 protein konsantrasyon ortalaması $\pm$ standart sapması operasyon öncesi 15736 ± 19094 pg/ml, operasyon sonrası 16655 ± 17334 pg/ml olarak bulunmuştur. En yüksek operasyon öncesi HMGB1 protein konsantrasyonu 76814 pg/ml iken en düşük değer 4425 pg/ml'dir. Operasyon sonrası ise en yüksek konsantrasyon 58885 pg/ml, en düşük konsantrasyon 1732 pg/ml olarak bulunmuştur.

Serumda OPN protein konsantrasyon ortalaması $\pm$ standart sapması operasyon öncesi 87.11 ± 75.87 ng/ml, operasyon sonrası 75.75 ± 71.5 ng/ml olarak bulunmuştur. En yüksek operasyon öncesi OPN protein konsantrasyonu 229.70 ng/ml iken en düşük değer 0.95 ng/ml'dir. Operasyon sonrası ise en yüksek konsantrasyon 225.022 ng/ml, en düşük konsantrasyon 1.06 ng/ml olarak bulunmuştur.

Serumlarda FSTL1, HMGB1 ve OPN proteinlerinin konsantrasyonlarının operasyon öncesi ve sonrası farklı olup olmadığının değerlendirilebilmesi için Wilcoxon Signed Ranks testi uygulanmış ve istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Operasyon öncesi ve sonrası hastaların serumlarında ELISA yöntemi ile elde edilen ortalama FSTL1, HMGB1 ve OPN protein konsantrasyon seviyeleri Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Hastaların operasyon öncesi ve sonrası serumlarında FSTL1 proteini(a), HMGB1 proteini(b), OPN proteini(c) konsantrasyon seviyeleri. Elde edilen veriler, Wilcoxon Signed Ranks testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Operasyon öncesi ve sonrası serumlarda FSTL1, HMGB1 ve OPN protein konsantrasyonları arasında fark belirlenmemiştir ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya genelinde en yaygın ikinci kanser türüdür. 2020 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'na göre, yaklaşık 2,2 milyon yeni akciğer kanseri vakası tespit edilmiştir, bu da tüm kanser teşhislerinin %11,4'ünü oluşturmaktadır. Ayrıca, akciğer kanseri 1,8 milyon kişinin hayatını kaybetmesine neden olmuş ve bu, tüm kanser ölümlerinin %18'ine denk gelmektedir (Sung ve ark., 2021)

Akciğer kanserinin klinik çeşitliliği ve güvenli, tolere edilebilen etkili ilaçların eksikliği, hastalığın sistematik tedavisinin geliştirilmesini zorlaştırmıştır (Yang X. ve ark., 2024). Mutasyona uğramış onkogenleri hedef alan ilaçlar (tirozin kinaz inhibitörleri gibi) ve bağışıklık kontrol noktalarını engelleyen monoklonal antikorlarla tedavide önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da birçok hasta bu tedavilerden yararlanamamaktadır (Hirsch ve ark., 2017; Yang S. ve ark., 2019; Chaft ve ark., 2021; Lu S. ve ark., 2022)

Yapılan araştırmalar, akciğer kanserinin başlaması ve ilerlemesinin yalnızca kanser hücrelerinin genomik ve moleküler özellikleriyle değil, aynı zamanda tümör bağışıklık mikroçevresi ile etkileşimleriyle de belirlendiğini göstermiştir (Quail ve Joyce, 2013; Forde ve ark., 2014). Tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin yanı sıra stromal hücreler, fibroblastlar, T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, TAM'lar gibi hücreleri içerir TAM'lar, tümör mikroçevresini etkileyen anahtar bağışıklık hücreleri olarak kabul edilmektedir (Quail ve Joyce, 2013; Hui ve Chen, 2015; Catacchio ve ark., 2018). TAM belirteçlerinin (CD68 gibi) immünohistokimyasal analizleri ve tek hücreli gen ifade profillemeye çalışmaları, TAM'ların çoğu kötü huylu solid tümörde miyeloid hücre infiltrasyonunun en büyük kısmını oluşturduğunu ve bu hücrelerin tümör dokularının istilasında yer alan ana bağışıklık hücreleri olduğunu ortaya koymuştur (Lahmar ve ark., 2016; Vitale ve ark., 2019)

Bu tez projesinde KHDAK'larında makrofajların M1 polarizasyon belirteci CCR7 ve M2 polarizasyon belirteci CD206 ile FSTL1, OPN ve HMGB1 proteinlerinin ekspresyon profilleri arasında istatistiksel olarak pozitif veya negatif bir ilişkinin bulunup bulunmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. FSTL1, OPN ve HMGB1

proteinlerinin ekspresyonlarının yanında bu proteinleri kodlayan genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonlarına da bakılmıştır. Hedeflenen proteinlerden OPN'nin, makrofaj göçü ile ilişkisi daha önceden raporlandığından (Zhang Yan ve ark., 2017) ve makrofajların M2 polarizasyonu ile ilişkilendirildiğinden, bu çalışmada da CD206 ve OPN ekspresyonları arasında istatistiksel olarak bir ilişki olup olmadığına bakılmış ama tümör dokusunda CD206 ekspresyonu ile OPN ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Tümör ve tümöre komşu normal dokularda CD206 protein ekspresyonu karşılaştırıldığında tümör dokusunda CD206 protein ekspresyonunda yükseliş gözlenmiş ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu durum çalışılan hasta sayısının (n=15) az olması ile açıklanabilir. Diğer taraftan, tümör dokusunda CD206 protein ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında anlamlı ilişki ($p=0.033$) bulunmuştur: Tümör çapı büyüdükçe CD206 protein ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Literatürde bugüne kadar TAM'lar ile ilgili çalışmalara bakıldığında; Zhang ve ekibi, Kaplan-Meier yöntemi ile akciğer kanseri hastalarının hayatta kalma süresini analiz etmiş ve tümör dokularında yüksek yoğunluklu TAM istilasının hastalar için kötü prognozla ilişkili olduğunu gözlemlemiştir (Zhang B. ve ark., 2011). Diğer iki çalışma, tümör büyümesi ve ilerlemesinin, TAM'ların tümör bölgesine toplanması ve polarizasyonu ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Lee H.-W. ve ark., 2013; Wu T. ve Dai, 2017). Ayrıca, TAM'ların salgıladığı sitokinler, kanser istilası ve metastazı için elverişli bir mikroçevre oluşturarak, TAM'ların akciğer kanseri tedavisinde potansiyel bir hedef olduğunu desteklemektedir (Wang R. ve ark., 2011a).

Kawaguchi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada akciğer adenokarsinom hastalarında immünohistokimyasal analiz sonucunda CD206'nın yüksek ekspresyonun tümör nüksü ve düşük genel sağkalım oranları ile ilişkili olduğunu bulmuştur (Kawaguchi ve ark., 2023). Bu tezde; tümör çapı 4cm'den büyük 6 olgunun 5'inin adenokarsinom tanılı olması ve bu olgularda CD206 protein ekspresyonun yüksek olması bu çalışmayı desteklemektedir. Aynı çalışmada, Lewis akciğer karsinom (LLC) tümörü taşıyan C57BL/6J farelerine nimesulid tedavisi uygulanmış ve TME'de CD206-pozitif TAM'ların azaldığı, tümör büyümesinin ise gerilediği gözlemlenmiştir (Kawaguchi ve ark., 2023) Daha önce yapılan iki çalışmada da CD206-pozitif TAM'ların azalmasının, in vivo olarak LLC tümör büyümesini engellediği bildirilmiştir. Bu çalışmalardan

ilkinde Qin ve arkadaşları, CD206-pozitif TAM'lerde yüksek düzeyde eksprese edilen P2X7 inhibitörünün uygulanmasının TME'de CD206-pozitif TAM'ları ortadan kaldırdığını ve tümör büyümesini azalttığını göstermiştir (Qin ve ark., 2020). Benzer ikinci çalışmada, Lu ve arkadaşları ise, kanser kök hücre belirteci olan Oct-4 inhibitörünün uygulanmasının, tümör hücrelerinden CSF-1 salgılanmasını azalttığını, bunun da TME'de CD206-pozitif TAM'ları miktarını azaltarak tümör büyümesini engellediğini ortaya koymuştur (Lu C.-S. ve ark., 2020). Bu literatür bilgilerine dayanarak bu çalışmada gösterilen tümör dokusunda CD206 protein ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında anlamlı korelasyonun hasta sayımızın az olmasına rağmen istatistiksel olarak hastaların prognozunu değerlendirilmesi açısından anlamlı bir veri olarak göz önünde bulundurabileceğini düşündürmektedir. Bu olguların nüks ve sağkalım süreleri açısından takip edilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda; *HMGB1* mRNA ekspresyonu düzeyinde tümör ve tümöre komşu normal dokuda fark bulunmazken, *HMGB1* protein ekspresyonu tümöre komşu normal dokuda tümöre kıyasla daha yüksek ekspresyon göstermiştir. *HMGB1* ekspresyonunda protein düzeyinde farklılık varken mRNA düzeyinde farkın gözlenmemesi post-transkripsiyonel veya post-translasyonel düzenlenmeler ile açıklanabilir.

Bir diğer bulgumuz, tümör dokusunda *HMGB1* mRNA ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında pozitif ($p=0.002$) korelasyonun bulunmuş olmasıdır. Tümör ve tümöre komşu normal dokuları çalışılan hasta sayısının ($n=15$) az olması nedeniyle, *HMGB1* mRNA ekspresyonu açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Literatürde daha önce *HMGB1* geninin ekspresyonu ile yapılan çalışmalardan birinde Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 30 akciğer kanseri hasta dokusunda *HMGB1* mRNA ekspresyonu ile tümör büyüklüğü ve TNM evreleme arasında korelasyon bulmuştur (Wang X.-h. ve ark., 2020). KHK'de *HMGB1* ekspresyon seviyesinin hem dokularda hem de serumda sağlıklı kontrollerden istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu ve bu yüksek ekspresyonun, TNM evreleri ve KHK'nin tümör boyutu ile korelasyon içinde olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Shang ve ark., 2009; Liu P.-L. ve ark., 2010; Sun K.-K. ve ark., 2013; Wang X.-h. ve ark., 2020). Bu bulgular, *HMGB1*'in KHK ilerlemesini değerlendirmek için yararlı bir klinik

belirteç olabileceğini ve potansiyel prognostik değere sahip olduğunu desteklemektedir.

HMGB1'in tümörün ilerlemesinde nasıl katkıda bulunduğu ile ilgili birden fazla moleküler mekanizma ileri sürülebilir: İlk olarak, HMGB1'in hücre proliferasyonunu destekleyen yolları aktive edebilme (Xu ve ark., 2019; Lin T. ve ark., 2021) özelliğinin olması nedeniyle, yüksek HMGB1 ekspresyonu, tümör hücrelerinin daha hızlı bölünmesine yol açarak tümörün büyümesine katkıda bulunabilir. İkinci olarak, HMGB1, tümör çevresinde yeni kan damarlarının oluşumunu destekleyerek, kan damarlarının artması (Yasinska ve ark., 2018; Kam ve ark., 2022) ardından tümöre daha fazla oksijen ve besin sağlayarak tümörün büyümesine katkı sağlayabilir. Üçüncü olarak, HMGB1 bağışıklık sistemi hücrelerini modüle ederek örneğin, bağışıklık baskılayıcı hücrelerin (Treg hücreleri gibi) (Yeung ve ark., 2015) artmasına veya immün yanıtın zayıflamasına neden olarak, TME'yi pro-tümör hale getirebilir. Dördüncüsü, HMGB1, tümör hücrelerinin çevre dokulara invaze olmasını ve metastaz yapmasını (Yi ve ark., 2021) kolaylaştırabilir. HMGB1, hücrelerin stres koşullarına yanıt olarak otofaji süreçlerini düzenleyebilir (Zhang Q. Y. ve ark., 2015). Otofaji, hücrelerin hayatta kalmasını sağlayarak tümör büyümesini destekleyebilir. Altıncısı, HMGB1, *KRAS* gibi onkogenlerin promotörüne bağlanarak (Wang Y. ve ark., 2024) transkripsiyonel aktivitesini artırması sonucu tümör büyümesini sağlayabilir. Bu, genetik düzeyde tümörün agresifliğini ve büyüklüğünü artırabilir. Son olarak, HMGB1, pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasını (Lu B. ve ark., 2012) destekleyebilir.

Yukarıda bahsedilen mekanizmalardan bir veya birkaçının kombinasyonu bulduğumuz korelasyonu açıklayabilir. HMGB1'nin tümör prognozu üzerindeki etkisini değerlendirmek ve potansiyel tedaviye yönelik hedefler olarak kullanmak için bu bulguyu daha kapsamlı çalışmalarla desteklemek gerektiği düşüncesindeyiz.

Bir başka bulgumuz hem tümöre komşu normal dokuda hem de tümör dokuda *FSTL1* ile *OPN* genlerin mRNA ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyonun bulunmasıdır ($p=0.027$, $p=0.035$). *FSTL1* mRNA ekspresyonu azalırken, *OPN* ekspresyonu artmaktadır. Literatüre bakıldığında *FSTL1*'in skuamöz

hücreli karsinomdan ziyade akciğer adenokarsinomlarında metastaz progresyonunu engelleyebilmede önemli rolü olduğu bilinmektedir. OPN, çeşitli kanser türlerinde aşırı eksprese olan bir kemokindir. Çoğunlukla metastatik özelliği olan kanser hastaların serumlarında OPN ekspresyon yüksek düzeyde belirlenmiştir. Chiou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metastatik hücrelerde, FSTL1'in OPN'ye direkt bağlanabildiğini ve OPN'nin proteolitik aktivitesini inhibe ettiğini dolayısıyla OPN aracılı CD44 yolağının aktivasyonunu engellediğini bulmuşlardır (Chiou ve ark., 2019).

Chiou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada olduğu gibi bizim olgularımızda da FSTL1 ekspresyonu düşerken OPN ekspresyonun yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak, bu iki protein arasındaki negatif korelasyon metastatik tümör özelliği ile ilişkilendirilirken çalışmamızdaki 15 olgudan sadece birinde metastaz varlığı belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak diğer 14 olguda metastaz gelişiminin değerlendirilebilmesi için takiplerinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Bu mekanizmaların ışığı altında, OPN proteininin, akciğer kanserinin oluşumu ve gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Subraman ve ark., 2015) . Yüksek OPN ekspresyonunun, KHDAK'de kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Rud ve ark., 2013; Zou ve ark., 2015). OPN'nin aşırı ekspresyonun, akciğer kanserinin invazyonunu arttırdığı ve tümörün TNM evresiyle pozitif bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca, OPN ve EGFR arasında sinerjik bir etki olduğu (Lin Q. ve ark., 2015b) OPN'nin integrin aracılığıyla bağlanmasının EGFR'nin kinaz aktivitesini uyarak EGFR gen transkripsiyonunu artırdığı bulunmuştur (Tuck ve ark., 2003). Anborg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 2018 yılında meme kanseri hücre hatlarında OPN'nin EGFR proteininde Tyr1068 fosforilasyonunu artırdığını doğrulamışlardır (Anborgh ve ark., 2018) OPN'nin EGFR fosforilasyonunu etkiliyor olması, TKI'nin uygulanmasında önemli rol oynayabilecektir. Ardından Wang ve arkadaşları 2021 yılındaki yayınlarında akciğer adenokarsinomunda OPN ve EGFR proteinlerinin interaksiyona girmesinin TKI dirençliliğine yol açabileceğini ve immünoterapide OPN proteinin hedeflenebileceğini bildirmişlerdir (Wang Y.-J. ve ark., 2021). Zhang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, FSTL1 ekspresyonunun akciğer metastazı olan meme kanseri dokusunda ve hastalarının serumunda azaldığını

göstermişler ve serumdaki FSTL1 seviyelerinin azalmasının kanser dokularında EGFR'in artan ekspresyonuyla ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Zhang Ying ve ark., 2018b). Literatürdeki bu bilgiler göze alındığında *FSTL1* geni ekspresyonu ile *OPN* geni ekspresyonunun ilişkilendirilmesine dair faktör EGFR olarak ön plana çıkabilmektedir. Mutasyon analizi yapılan hastalarımızın 5'inde (2,3,5,11,12 numaralı hastalar) *EGFR*, *ALK* ve *ROS1* genlerinin mutasyon analiz sonuçlarının negatif olduğu bilinmektedir. 15 numaralı hastanın ise *EGFR* geninde ekzon 21'de L858R mutasyonuna sahip olduğu ve *ALK* ve *ROS1* genlerinde mutasyon olmadığı bilinmektedir. Geriye kalan hastalarda bu genlere ait mutasyon testi yapılmadığı için bu hastaların mutasyon açısından değerlendirilmesi yapılamamıştır. Başka bir proje kapsamında *EGFR*, *ALK* ve *ROS1* genlerinde mutasyon olup olmadığı bilinmeyen olgularda mutasyon analizi yapılarak *FSTL1*, *OPN* genlerinin mutasyon taşıyan ve taşımayan gruplar arasında hasta tedavilerinde yanıtta etkilerin değerlendirilmesi mümkün olabilecektir.

Tez projesi kapsamında tümör dokusunda FSTL1 protein ekspresyonu ile HMGB1 protein ekspresyonu arasında bir korelasyon olduğu ($p=0.017$) belirlenmiştir. FSTL1 ekspresyonu düşükken, HMGB1 ekspresyonun da düşük olduğu görülmektedir. Tümör dokusunda bulduğumuz bu korelasyonun ortaya çıkmasını başka mekanizmaların tetikleyebileceğini söyleyebiliriz. HMGB1, hasar görmüş veya ölen hücrelerden salınan bir tehlike sinyali (DAMP) olarak bilinmektedir ve 2012 yılında yapılan bir çalışmada FSTL1'in DAMP gibi olabileceği düşünülmüştür. Çünkü FSTL1'in DAMP'ler gibi TLR4 sinyal yolağı üzerinden doğuştan gelen immün sistemi uyardığı belirlenmiştir (Murakami ve ark., 2012). Literatürde bu iki proteinin birlikte çalışıldığı herhangi bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bu çalışmada bu iki protein arasındaki korelasyon ilk kez gösterilmiş olup öncelikle, FSTL1'in de inflamatuvar süreçlerde rol oynadığı bilindiğinden, HMGB1 ile birlikte FSTL1'in akciğer kanserinde TME'de inflamasyonu düzenleme rolünü üstlenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Diğer taraftan hem FSTL1 hem de HMGB1, tümör mikroçevresinde bağışıklık hücrelerinin davranışını değiştirebilir. HMGB1, bağışıklık hücrelerini tümöre çekerken aynı zamanda immünosupresif hücrelerin de aktivitesini artırabilir. FSTL1 de benzer şekilde bağışıklık hücrelerinin tümördeki rolünü etkileyebilir, bu da tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasını kolaylaştırabilir. Bu iki

protein birlikte rolü hakkında *in vitro* çalışmalar yapılarak, ortaya atılan hipotezlerin doğrulanmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada hastaların tümör ve tümöre komşu normal dokularında FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 proteinlerinin göreceli ekspresyonlarını incelenmiştir. 6 numaralı hastada tümöre komşu normal dokuda FSTL1'in neredeyse hiç eksprese edilmediği görülmüştür. Bunun sebebi normal dokuda FSTL1 ekspresyonunu inhibe edecek epigenetik değişimler (DNA metilasyonu, histon modifikasyonları) gerçekleşmiş olabilir. IHC kaynaklı olarak, doku kalitesi ve dokunun sabitlenmesi aşamasında diğer tüm hastalara aynı deneysel prosedür uygulanmış olup, antikor kalitesinin spesifik ve duyarlı olduğu görülmüştür. 6 numaralı hastanın doku kalitesi IHC analizi için uygun görüldüğünden deneysel olarak yaşanabilecek problemleri dışlamış bulunmaktayız. Dolayısıyla deneysel kaynaklı bir problemin olmaması bireysel farklılığın yanı sıra başka birçok faktörün dokudaki ekspresyonunu etkileyebileceğini bize düşündürmektedir. 7 numaralı hastanın tümör dokusunda FSTL1 ekspresyonunun yüksek görülmesinin en önemli sebebi hastada oluşan kanserin erken evrede (pT1min) olması olabilir. HMGB1 protein ekspresyonu 3 ve 6 numaralı hastaların tümör dokusunda tümöre komşu normal dokuya kıyasla yüksek bulunmuştur. Her iki hasta da sigara kullanan ve tümör histolojik alt tipi adenokarsinom olan olgulardır. Birkaç çalışmada, KHDAK hastaların hem doku hem de serum örneklerinde sağlıklı bireylere ait örneklerle kıyasla istatistiksel olarak HMGB1 ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. (Shang ve ark., 2009; Liu P.-L. ve ark., 2010; Sun K.-K. ve ark., 2013). Ancak başka bir çalışmada KHDAK dokusundaki HMGB1 ekspresyonunun mRNA ve protein seviyesinde normal akciğer dokusuyla karşılaştırıldığında düşük olduğu gösterilmiştir (Shen ve ark., 2009). Hastaların klinik veya genetik farklılıkları, tümör heterojenitesin farklı olması, HMGB1 ilişkili yolları farklı şekilde aktive edebilmesi gibi ihtimallerin varlığı çalışmamızdaki iki hastanın (3 ve 6 numaralı) tümör dokusunda HMGB1 ekspresyonun yüksek bulunmasının sebepleri arasında yer alabileceğini düşündürmektedir. 2 ve 14 numaralı hastalarda OPN ekspresyonu tümör dokuda tümöre komşu normal dokuya kıyasla düşük bulunmuştur. İki hastanın cinsiyeti erkek olup 2 numaralı hasta adenokarsinom 14 numaralı hasta ise skuamöz tipi tümöre sahiptir. Tümör histolojik alt tipinin OPN ekspresyonunda etkisi olmayabilir. Her

hastada tümör progresyonu için OPN proteininden ziyade başka proteinler daha kritik rol oynayabilir. Bu hastalarda, OPN transkripsiyonunu baskılayan ve protein ekspresyonunun düşük olmasına neden olan genetik ve epigenetik değişiklikler olabilir. Literatürde Klement ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, farelere kolon tümör hücrelerini transplante ettikten sonra OPN genin interferon-uyarıcı yanıt elementlerine myeloid hücrelerin makrofaj farklılaşmasını sağlayan transkripsiyon faktörü interferon regüle edici faktör 8 (IRF8) bağlanarak OPN genini baskıladığını bulmuşlardır (Klement ve ark., 2018). 10 ve 11 numaralı hastaların tümör dokusunda CCR7 ekspresyonu tümöre komşu normal dokuya kıyasla yüksek bulunmuştur. Literatüre bakıldığında M1 makrofaj polarizasyon belirteci olarak kullanılan CCR7'nin (Kwiecien ve ark., 2019), makrofajlara ek olarak B hücrelerinde, dentritik hücrelerde, bazı nötrofillerde ve naif T hücrelerinde de ekspresyon göstermektedir. Dolayısıyla bu iki hastanın tümör mikroçevresindeki bu hücrelerden kaynaklı ekspresyon artışı söz konusu olabilir. 4 ve 5 numaralı hastaların her ikisi de skuamöz histolojik tipe sahip hastalar olup, tümör dokusunda M2 tip makrofaj belirteci CD206 ekspresyonu tümöre komşu normal dokuda neredeyse hiç görülmemiştir. Ancak hastaların normal dokularına bakıldığında M1 tip makrofaj belirteci olan CCR7 ekspresyonunun yüksek olduğunu görmekteyiz. Bu hastaların diğer hastalara kıyasla bağışıklık yanıtında farklılıklarından kaynaklı tümör mikroçevresinde M2 makrofajlardan ziyade M1 tip makrofajların daha baskın olması düşünülebilir. IL-4, IL-10, TGF- β gibi sitokinler makrofajların M2 tipte olmasını sağlar (Guenther ve ark., 2012; Porta ve ark., 2015). Bu hastaların tümörlerinde bu sitokinlerin yeterince salınmaması CD206 ekspresyonunun neredeyse hiç olmayışına yol açmış olabilir. M2 makrofajları homojen bir grup değildir (Murray, 2017). Farklı M2 alt tipleri CD206'yı farklı seviyelerde eksprese edebilir. Bu hastalarda, CD206'yı eksprese etmeyen, ancak tümör ilerlemesine katkı sağlayan farklı makrofaj alt tipleri baskın olabilir. 13 ve 14 numaralı hastaların tümöre komşu normal dokularında tümör dokusuna kıyasla CD206 ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Her iki hastanın kliniği incelendiğinde skuamöz histolojik alt tipi olduğu, aynı tümör boyutu (1,8cm), EvreIA ve sigara içiciliği olduğu gözlenmiştir. Tüm bu özellikleri aynı olan bu iki hastada, tümöre komşu normal dokularda inflamatuvar yanıt süreçlerin daha aktif olduğu bir alan olabilir. Tümör dokusuna kıyasla, tümör çevresindeki inflamasyon yanıtı, CD206 ekspresyonu olan

makrofajları bölgeye çekebilir. M2 makrofajları, tümörün yayılmasını desteklemek için tümör mikroçevresini hazırlıyor olabileceğinden CD206 ekspresyonu tümöre komşu normal dokuda yüksek çıkmış olabilir. Literatüre bakıldığında hepatoselüler karsinom hastalarının tümör ve tümöre komşu normal dokularında IHC yöntemiyle CD206 boyaması yapıldığında, CD206 yoğunluğu tümöre komşu normal dokularda yüksek bulunmuştur (Ren ve ark., 2017).

Hastaların operasyon öncesi ve sonrası serumlarında baktığımız FSTL1, HMGB1 ve OPN protein konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulamamız proje amacıyla hedeflediğimiz operasyonel stresi dışlama önerimizi desteklemiştir.

Hastaların sigara içiciliği ile diğer bulguları arasında herhangi bir korelasyon testi sigara içmeyen hasta sayısı en az 4 olmadığı için yapılamamıştır. Bu nedenle sigara içiciliğinin hedeflenen proteinlerin ve mRNA'ların ekspresyonları ile ilişkili olup olmadığı açıklığa kavuşturulamamıştır.

Çalışmamızda ailesinde kanser öyküsü olan 4 hastanın (1,4,7 ve 9 numaralı) özellikle p53 gen mutasyonları bilinmemektedir. Bu hastalarda p53 mutasyonun araştırıldığı bir başka çalışma yapılarak, elimizdeki verileri daha zengin hale getirebileceğiz. Aynı zamanda hem hasta hem de hasta yakınlarının kansere yatkınlık açısından bilgilendirilerek ailelerin bu konuda bilinçlenmesine katkı sunabilecektir.

Çalışmamızın limitasyonları, çalışılan tümör örnek sayısının azlığı, histolojik özellik açısından tek tip dokunun seçilememesi, akciğer M1-M2 makrofaj polarizasyonu ile FSTL1, OPN ve HMGB1 ekspresyonları arasında bir bağlantı olup olmadığını göstermek için en ideal yöntem olan çok renkli akım sitometri yönteminin uygulanamamasıdır. Hem doktora tez projemiz için başvurabileceğimiz proje bütçelerinin hem de kurumumuz olanaklarının yetersizliği nedeni ile akım sitometri yöntemi uygulanamamıştır.

Sonuç olarak bu tez projesinde, M1 makrofaj belirteci olarak CCR7 ve M2 makrofaj belirteci olarak CD206 kullanılarak belirlenen makrofaj polarizasyonu ile, FSTL1, HMGB1 ve OPN proteinleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Bu üç protein ile M1 ve M2 makrofaj belirteçleri arasında bir ilişki kurulamamıştır. Ancak,

M2 makrofaj belirteci CD206'nın tümör büyüklüğü ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla M2 makrofaj belirteci CD206'nın hasta prognozunun değerlendirilmesi açısından önemli bir faktör olabileceğini düşünmekteyiz. FSTL1 ve HMGB1 proteinleri arasındaki korelasyon ilk kez bu çalışmada gösterilmiş olup, küçük hücreli dışı akciğer karsinomu tümör mikroçevresinde rolü olan FSTL1, HMGB1 ve OPN proteinlerinin rollerini destekleyici veriler elde edilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

KHDAK dokusunda FSTL1 protein ekspresyonu ile HMGB1 protein ekspresyonu arasında saptamış olduğumuz anlamlı korelasyon bulgusu ile literatüre katkı sağlanacaktır. Ayrıca bu iki proteinin kanser hücrelerinde birlikte etkilerine bakabilmek için *in vitro* çalışmaları içeren yeni projelerin yapılması mümkün olabilecektir.

Tümör dokuda bulduğumuz *FSTL1* geninin mRNA ekspresyonu ile OPN arasında anlamlı korelasyonu açıklayabilmek için hastaların tümör histolojisinin adenokarsinom tipte olmasının ve metastazının bulunmasının kriter olarak seçildiği yeni çalışmalar yapılabilir. Bu çalışmalara ek olarak *EGFR*, *KRAS* genlerinde mutasyonu olan ve olmayan hasta gruplarında bu iki genin değerlendirilmesi ve protein seviyesinde de araştırılmasının daha anlamlı olacağı düşüncesindeyiz.

Akım sitometri yöntemiyle makrofajlarda FSTL1, HMGB1, OPN, CCR7 ve CD206 protein ekspresyonları spesifik olarak hücresel düzeyde (hücrelere özgü belirteçlerle birlikte) değerlendirilerek daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Çalışmamızda sadece bir hastada metastaz görüldüğünden FSTL1, HMGB1 ve OPN proteinlerinin metastaz ile ilişkisi hakkında bir yorum yapılamamıştır.

Hastalarda M2 makrofaj markerı CD206 protein ekspresyonu ile tümör büyüklüğü arasında bulduğumuz korelasyonu desteklemek için hastaların histolojik özelliklerinin tek tip olduğu ve hasta sayısının daha yüksek olduğu çalışma planlanmaktadır.

Hasta sayısının artmasıyla sigara içmeyen hasta sayısının da artması durumunda bu protein ekspresyonlarının, sigara içiciliği ile bağlantılı olup olmadığının değerlendirilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Ahmed M, Behera R, Chakraborty G, Jain S, Kumar V, Sharma P , ve ark. Osteopontin: A potentially important therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011; 15: 1113-1126.
- Amin HM, Lai R. Pathobiology of alk⁺ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2007; 110: 2259-2267.
- An J, Wang L, Zhao Y, Hao Q, Zhang Y, Zhang J , ve ark. Effects of fstl1 on cell proliferation in breast cancer cell line mda-mb-231 and its brain metastatic variant mda-mb-231-br. *Oncol Rep*. 2017; 38: 3001-3010.
- Anborgh PH, Lee DJ, Stam PF, Tuck AB, Chambers AF. Role of osteopontin as a predictive biomarker for anti-egfr therapy in triple-negative breast cancer. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2018; 22: 727-734.
- Bandopadhyay M, Bulbule A, Butti R, Chakraborty G, Ghorpade P, Ghosh P , ve ark. Osteopontin as a therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2014; 18: 883-895.
- Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Ann Glob Health*. 2019; 85.
- Bastos ACSdF, Gomes AVP, Silva GR, Emerenciano M, Ferreira LB, Gimba ERP. The intracellular and secreted sides of osteopontin and their putative physiopathological roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24: 2942.
- Belli C, Trapani D, Viale G, D'Amico P, Duso BA, Della Vigna P , ve ark. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treat Rev*. 2018; 65: 22-32.
- Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol Rev*. 2017; 280: 74-82.
- Biswas SK, Chittezhath M, Shalova IN, Lim J-Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. *Immunologic research*. 2012; 53: 11-24.
- Blandin Knight S, Crosbie PA, Balata H, Chudziak J, Hussell T, Dive C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open biology*. 2017; 7: 170070.
- Bosco MC. Macrophage polarization: Reaching across the aisle? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019; 143: 1348-1350.
- Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JC, Han JY, Lee JS , ve ark. Brigatinib versus crizotinib in alk-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018; 379: 2027-2039.
- Cantor H, Shinohara ML. Regulation of t-helper-cell lineage development by osteopontin: The inside story. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9: 137-141.
- Cao L, Che X, Qiu X, Li Z, Yang B, Wang S , ve ark. M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer management and research*. 2019: 6125-6138.
- Catacchio I, Scattoni A, Silvestris N, Mangia A. Immune prophets of lung cancer: The prognostic and predictive landscape of cellular and molecular immune markers. *Translational oncology*. 2018; 11: 825-835.
- Chaff JE, Rimner A, Weder W, Azzoli CG, Kris MG, Cascone T. Evolution of systemic therapy for stages i–iii non-metastatic non-small-cell lung cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2021; 18: 547-557.
- Chan QK, Ngan HY, Ip PP, Liu VW, Xue WC, Cheung AN. Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis: A differential expression and functional analysis. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 114-121.
- Chen P, Zuo H, Xiong H, Kolar MJ, Chu Q, Saghatelian A , ve ark. Gpr132 sensing of lactate mediates tumor–macrophage interplay to promote breast cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017a; 114: 580-585.

- Chen SX, Xu XE, Wang XQ, Cui SJ, Xu LL, Jiang YH , ve ark. Identification of colonic fibroblast secretomes reveals secretory factors regulating colon cancer cell proliferation. *J Proteomics*. 2014; 110: 155-171.
- Chen Y-C, Statt S, Wu R, Chang H-T, Liao J-W, Wang C-N , ve ark. High mobility group box 1-induced epithelial mesenchymal transition in human airway epithelial cells. *Scientific reports*. 2016; 6: 18815.
- Chen Y, Zhang S, Wang Q, Zhang X. Tumor-recruited m2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via m2 macrophage-secreted chi3l1 protein. *Journal of hematology & oncology*. 2017b; 10: 1-13.
- Chiou J, Su CY, Jan YH, Yang CJ, Huang MS, Yu YL, Hsiao M. Decrease of fstl1-bmp4-smad signaling predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2017; 7: 9830.
- Chiou J, Chang YC, Tsai HF, Lin YF, Huang MS, Yang CJ, Hsiao M. Follistatin-like protein 1 inhibits lung cancer metastasis by preventing proteolytic activation of osteopontin. *Cancer Res*. 2019; 79: 6113-6125.
- Cho HJ, Jung JI, Lim DY, Kwon GT, Her S, Park JH, Park JHY. Bone marrow-derived, alternatively activated macrophages enhance solid tumor growth and lung metastasis of mammary carcinoma cells in a balb/c mouse orthotopic model. *Breast cancer research*. 2012; 14: 1-12.
- Cho WY, Hong SH, Singh B, Islam MA, Lee S, Lee AY , ve ark. Suppression of tumor growth in lung cancer xenograft model mice by poly(sorbitol-co-pe) mediated delivery of osteopontin sirna. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 94: 450-462.
- Czura CJ, Wang H, Tracey KJ. Dual roles for hmgb1: DNA binding and cytokine. *Journal of endotoxin research*. 2001; 7: 315-321.
- Dai F, Liu L, Che G, Yu N, Pu Q, Zhang S , ve ark. The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2010; 10: 1-10.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*. 2011; 32: 605-644.
- Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: A protein with diverse functions. *FASEB J*. 1993; 7: 1475-1482.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: Regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *The Journal of clinical investigation*. 2001; 107: 1055-1061.
- Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S, Rittling SR. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: Evidence for a ras-activated enhancer in the human opn promoter. *Clin Exp Metastasis*. 2003; 20: 77-84.
- Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the ajcc cancer staging manual and the future of tnm. *Annals of surgical oncology*. 2010; 17: 1471-1474.
- Esterberg R, Delalande JM, Fritz A. Tailbud-derived bmp4 drives proliferation and inhibits maturation of zebrafish chordamesoderm. *Development*. 2008; 135: 3891-3901.
- Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR , ve ark. Non-small cell lung cancer, version 5.2017, nccn clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2017; 15: 504-535.
- Forde PM, Kelly RJ, Brahmer JR. New strategies in lung cancer: Translating immunotherapy into clinical practice. *Clinical Cancer Research*. 2014; 20: 1067-1073.
- Gainor JF, Shaw AT, Sequist LV, Fu X, Azzoli CG, Piotrowska Z , ve ark. Egfr mutations and alk rearrangements are associated with low response rates to pd-1 pathway blockade in non-small cell lung cancer: A retrospective analysis. *Clin Cancer Res*. 2016; 22: 4585-4593.

- Gardner HA, Berse B, Senger DR. Specific reduction in osteopontin synthesis by antisense rna inhibits the tumorigenicity of transformed rat1 fibroblasts. *Oncogene*. 1994; 9: 2321-2326.
- Gdynia G, Keith M, Kopitz J, Bergmann M, Fassl A, Weber AN , ve ark. Danger signaling protein hmgb1 induces a distinct form of cell death accompanied by formation of giant mitochondria. *Cancer Res*. 2010; 70: 8558-8568.
- Geng Y, Dong Y, Yu M, Zhang L, Yan X, Sun J , ve ark. Follistatin-like 1 (fstl1) is a bone morphogenetic protein (bmp) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108: 7058-7063.
- Gimba E, Tilli T. Human osteopontin splicing isoforms: Known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer letters*. 2013; 331: 11-17.
- Gregg JP, Li T, Yoneda KY. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: Optimizing the diagnostic journey. *Transl Lung Cancer Res*. 2019; 8: 286-301.
- Guenther S, Vrekoussis T, Heublein S, Bayer B, Anz D, Knabl J , ve ark. Decidual macrophages are significantly increased in spontaneous miscarriages and over-express fasl: A potential role for macrophages in trophoblast apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 9069-9080.
- Han JY, Park K, Kim SW, Lee DH, Kim HY, Kim HT , ve ark. First-signal: First-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 1122-1128.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- He C, Sun S, Zhang Y, Xie F, Li S. The role of irreversible electroporation in promoting m1 macrophage polarization via regulating the hmgb1-rage-mapk axis in pancreatic cancer. *Oncoimmunology*. 2021; 10: 1897295.
- Herbst RS, Heymach JV, Lippman S. Molecular origins of cancer. *n engl J Med*. 2008; 359: 1367-1380.
- Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res*. 2019; 79: 4557-4566.
- Hirayama S, Ishii G, Nagai K, Ono S, Kojima M, Yamauchi C , ve ark. Prognostic impact of cd204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma: Possible contribution of cd204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment. *Journal of thoracic oncology*. 2012; 7: 1790-1797.
- Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L. Lung cancer: Current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*. 2017; 389: 299-311.
- Hou J, Ji J, Chen X, Cao H, Tan Y, Cui Y , ve ark. Alveolar epithelial cell-derived sonic hedgehog promotes pulmonary fibrosis through opn-dependent alternative macrophage activation. *The FEBS Journal*. 2021; 288: 3530-3546.
- Hu H, Hang J-J, Han T, Zhuo M, Jiao F, Wang L-W. The m2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumor Biology*. 2016; 37: 8657-8664.
- Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer letters*. 2015; 368: 7-13.
- Hung C-H, Chen F-M, Lin Y-C, Tsai M-L, Wang S-L, Chen Y-C , ve ark. Altered monocyte differentiation and macrophage polarization patterns in patients with breast cancer. *BMC cancer*. 2018; 18: 1-9.
- Hwang I, Kim JW, Ylaya K, Chung EJ, Kitano H, Perry C , ve ark. Tumor-associated macrophage, angiogenesis and lymphangiogenesis markers predict prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Journal of translational medicine*. 2020; 18: 1-15.
- Ibrahim ZA, Armour CL, Phipps S, Sukkar MB. Rage and tlrs: Relatives, friends or neighbours? *Molecular immunology*. 2013; 56: 739-744.

- Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskienė B, Miliauskas S, Vaitkienė S, Sakalauskas R. Distribution of m1 and m2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC immunology*. 2018; 19: 1-13.
- Jani C, Marshall DC, Singh H, Goodall R, Shalhoub J, Al Omari O , ve ark. Lung cancer mortality in europe and the USA between 2000 and 2017: An observational analysis. *ERJ Open Res*. 2021; 7.
- Junaid A, Moon MC, Harding GE, Zahradka P. Osteopontin localizes to the nucleus of 293 cells and associates with polo-like kinase-1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292: C919-926.
- Kadota K, Nitadori J-i, Rekhtman N, Jones DR, Adusumilli PS, Travis WD. Reevaluation and reclassification of resected lung carcinomas originally diagnosed as squamous cell carcinoma using immunohistochemical analysis. *The American journal of surgical pathology*. 2015; 39: 1170.
- Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB , ve ark. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American society of clinical oncology endorsement of the college of american pathologists/international association for the study of lung cancer/association for molecular pathology clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018; 36: 911.
- Kalemkerian GP, Schneider BJ. Advances in small cell lung cancer. *Hematology/Oncology Clinics*. 2017; 31: 143-156.
- Kam NW, Wu KC, Dai W, Wang Y, Yan LYC, Shakya R , ve ark. Peritumoral b cells drive proangiogenic responses in hmgb1-enriched esophageal squamous cell carcinoma. *Angiogenesis*. 2022; 25: 181-203.
- Kamalabadi-Farahani M, Atashi A, Jabbarpour Z, Aghayan SS. Expression of osteopontin-5 splice variant in the mouse primary and metastatic breast cancer cells. *BMC Research Notes*. 2022; 15: 286.
- Kang CG, Han HJ, Lee HJ, Kim SH, Lee EO. Rho-associated kinase signaling is required for osteopontin-induced cell invasion through inactivating cofilin in human non-small cell lung cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015; 25: 1956-1960.
- Kang R, Zhang Q, Zeh III HJ, Lotze MT, Tang D. Hmgb1 in cancer: Good, bad, or both? *Clinical cancer research*. 2013; 19: 4046-4057.
- Kaseda K, Ishii G, Aokage K, Takahashi A, Kuwata T, Hishida T , ve ark. Identification of intravascular tumor microenvironment features predicting the recurrence of pathological stage i lung adenocarcinoma. *Cancer science*. 2013; 104: 1262-1269.
- Kawaguchi Y, Ohshio Y, Watanabe A, Shiratori T, Okamoto K, Ueda K , ve ark. Depletion of tumor-associated macrophages inhibits lung cancer growth and enhances the antitumor effect of cisplatin. *Cancer science*. 2023; 114: 750-763.
- Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T , ve ark. Predominant infiltration of macrophages and cd8+ t cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage iv nonsmall cell lung cancer. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2008; 113: 1387-1395.
- Kawata M, Koinuma D, Ogami T, Umezawa K, Iwata C, Watabe T, Miyazono K. Tgf- β -induced epithelial-mesenchymal transition of a549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from raw 264.7 macrophage cells. *The journal of biochemistry*. 2012; 151: 205-216.
- Kim D, Min H, Lee K, Kim Y, Oh D, Jeon Y , ve ark. High tumour islet macrophage infiltration correlates with improved patient survival but not with egfr mutations, gene copy number or protein expression in resected non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*. 2008; 98: 1118-1124.

- Kim Y, Wen X, Bae JM, Kim JH, Cho NY, Kang GH. The distribution of intratumoral macrophages correlates with molecular phenotypes and impacts prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2018; 73: 663-671.
- Klement JD, Paschall AV, Redd PS, Ibrahim ML, Lu C, Yang D, ve ark. An osteopontin/cd44 immune checkpoint controls cd8+ t cell activation and tumor immune evasion. *J Clin Invest*. 2018; 128: 5549-5560.
- Kozlova N, Grossman JE, Iwanicki MP, Muranen T. The interplay of the extracellular matrix and stromal cells as a drug target in stroma-rich cancers. *Trends in pharmacological sciences*. 2020; 41: 183-198.
- Kudo-Saito C, Fuwa T, Murakami K, Kawakami Y. Targeting fstl1 prevents tumor bone metastasis and consequent immune dysfunction. *Cancer Res*. 2013; 73: 6185-6193.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier health sciences; 2014.
- Kwiecien I, Polubiec-Kownacka M, Dziedzic D, Wolosz D, Rzepecki P, Domagala-Kulawik J. Cd163 and ccr7 as markers for macrophage polarization in lung cancer microenvironment. *Cent Eur J Immunol*. 2019; 44: 395-402.
- La Fleur L, Boura VF, Alexeyenko A, Berglund A, Pontén V, Mattsson JS, ve ark. Expression of scavenger receptor marco defines a targetable tumor-associated macrophage subset in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. 2018; 143: 1741-1752.
- Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2016; 1865: 23-34.
- Lee CK, Man J, Lord S, Cooper W, Links M, Gebiski V, ve ark. Clinical and molecular characteristics associated with survival among patients treated with checkpoint inhibitors for advanced non-small cell lung carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *JAMA oncology*. 2018; 4: 210-216.
- Lee H-W, Choi H-J, Ha S-J, Lee K-T, Kwon Y-G. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2013; 1835: 170-179.
- Li G, Ren H, Wu X, Hu Q, Hong Z, Wang G, ve ark. Follistatin like protein-1 modulates macrophage polarization and aggravates dextran sodium sulfate-induced colitis. *International Immunopharmacology*. 2020; 83: 106456.
- Li T, Kung H-J, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: Implications for current and future therapies. *Journal of Clinical Oncology*. 2013; 31: 1039.
- Li Z, Maeda D, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, ve ark. The intratumoral distribution influences the prognostic impact of cd68-and cd204-positive macrophages in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2018; 123: 127-135.
- Li Z, Zhou J, Umakoshi M, Goto A. The prognostic role of m2 tumor-associated macrophages in non-small-cell lung cancer. 2022.
- Lin L, Chen Y-S, Yao Y-D, Chen J-Q, Chen J-N, Huang S-Y, ve ark. Ccl18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer. *Oncotarget*. 2015a; 6: 34758.
- Lin Q, Guo L, Lin G, Chen Z, Chen T, Lin J, ve ark. Clinical and prognostic significance of opn and vegf expression in patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Epidemiol*. 2015b; 39: 539-544.
- Lin T, Zhang Y, Lin Z, Peng L. Roles of hmgb in prognosis and immunotherapy: A pan-cancer analysis. *Front Genet*. 2021; 12: 764245.
- Lin Y-H, Wu M-H, Yeh C-T, Lin K-H. Long non-coding rnas as mediators of tumor microenvironment and liver cancer cell communication. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19: 3742.

- Lin YH, Yang-Yen HF. The osteopontin-cd44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway. *J Biol Chem*. 2001; 276: 46024-46030.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH , ve ark. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the college of american pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the association for molecular pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2018; 142: 321-346.
- Liu P-L, Tsai J-R, Hwang J-J, Chou S-H, Cheng Y-J, Lin F-Y , ve ark. High-mobility group box 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression in non-small cell lung cancer contributes to tumor cell invasiveness. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010; 43: 530-538.
- Liu S, Wang L, Wang W, Lin J, Han J, Sun H , ve ark. Tsc-36/frp inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Exp Mol Pathol*. 2006; 80: 132-140.
- Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F, Yao Y-M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *International journal of biological sciences*. 2014; 10: 520.
- Lu B, Nakamura T, Inouye K, Li J, Tang Y, Lundback P , ve ark. Novel role of pkr in inflammasome activation and hmgb1 release. *Nature*. 2012; 488: 670-674.
- Lu C-S, Shiao A-L, Su B-H, Hsu T-S, Wang C-T, Su Y-C , ve ark. Oct4 promotes m2 macrophage polarization through upregulation of macrophage colony-stimulating factor in lung cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2020; 13: 1-16.
- Lu S, Wu L, Jian H, Chen Y, Wang Q, Fang J , ve ark. Sintilimab plus bevacizumab biosimilar ibi305 and chemotherapy for patients with egfr-mutated non-squamous non-small-cell lung cancer who progressed on egfr tyrosine-kinase inhibitor therapy (orient-31): First interim results from a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2022; 23: 1167-1179.
- Lund SA, Wilson CL, Raines EW, Tang J, Giachelli CM, Scatena M. Osteopontin mediates macrophage chemotaxis via $\alpha 4$ and $\alpha 9$ integrins and survival via the $\alpha 4$ integrin. *Journal of cellular biochemistry*. 2013; 114: 1194-1202.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW , ve ark. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*. 2004; 350: 2129-2139.
- Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The m1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC cancer*. 2010; 10: 1-9.
- Maeda R, Ishii G, Neri S, Aoyagi K, Haga H, Sasaki H , ve ark. Circulating cd14+ cd204+ cells predict postoperative recurrence in non-small-cell lung cancer patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2014; 9: 179-188.
- Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H , ve ark. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated egfr. *N Engl J Med*. 2010; 362: 2380-2388.
- Manser R, Lethaby A, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson MJ, Campbell D. Screening for lung cancer. *Cochrane database of systematic reviews*. 2013.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004; 25: 677-686.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2008; 13: 453-461.

- Meng Q, Zhao J, Liu H, Zhou G, Zhang W, Xu X, Zheng M. Hmgb1 promotes cellular proliferation and invasion, suppresses cellular apoptosis in osteosarcoma. *Tumor Biology*. 2014; 35: 12265-12274.
- Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J , ve ark. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (wjtog3405): An open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2010; 11: 121-128.
- Mittal V, El Rayes T, Narula N, McGraw TE, Altorki NK, Barcellos-Hoff MH. The microenvironment of lung cancer and therapeutic implications. *Lung Cancer and Personalized Medicine: Novel Therapies and Clinical Management*. 2016: 75-110.
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N , ve ark. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009; 361: 947-957.
- Murakami K, Tanaka M, Usui T, Kawabata D, Shiomi A, Iguchi-Hashimoto M , ve ark. Follistatin-related protein/follistatin-like 1 evokes an innate immune response via cd14 and toll-like receptor 4. *FEBS letters*. 2012; 586: 319-324.
- Murata M. Inflammation and cancer. *Environmental health and preventive medicine*. 2018; 23: 1-8.
- Murray PJ. Macrophage polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79: 541-566.
- Nagahashi M, Abe M, Sakimura K, Takabe K, Wakai T. The role of sphingosine-1-phosphate in inflammation and cancer progression. *Cancer science*. 2018; 109: 3671-3678.
- Naumnik W, Nilklińska W, Ossolińska M, Chyczewska E. Serum levels of hmgb1, survivin, and vegf in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2009; 47: 703-709.
- Ni X, Cao X, Wu Y, Wu J. Fstl1 suppresses tumor cell proliferation, invasion and survival in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 2018; 39: 13-20.
- Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN , ve ark. Small cell lung carcinoma (sclc): A clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *The American journal of surgical pathology*. 2002; 26: 1184-1197.
- Nogueira-Machado JA, Volpe CMdO, Veloso CA, Chaves MM. Hmgb1, tlr and rage: A functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2011; 15: 1023-1035.
- Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.
- Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: From mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014; 41: 49-61.
- Ohri C, Shikotra A, Green R, Waller D, Bradding P. Macrophages within nsclc tumour islets are predominantly of a cytotoxic m1 phenotype associated with extended survival. *European Respiratory Journal*. 2009; 33: 118-126.
- Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, Ashimine S, Kuwata T, Hishida T , ve ark. Stromal macrophage expressing cd204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*. 2010; 5: 1507-1515.
- Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR, Walsh K. Follistatin-like 1 is an akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation*. 2008; 117: 3099-3108.
- Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y, Walsh K. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2008; 283: 32802-32811.
- Packer L, Pavey S, Parker A, Stark M, Johansson P, Clarke B , ve ark. Osteopontin is a downstream effector of the pi3-kinase pathway in melanomas that is inversely correlated with functional pten. *Carcinogenesis*. 2006; 27: 1778-1786.

- Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front Immunol.* 2020; 11: 583084.
- Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: The role of the early t-lymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol.* 1993; 13: 225-246.
- Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: Unraveling a role in clinical practice. *Journal of thoracic oncology.* 2014; 9: 273-284.
- Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW , ve ark. Alectinib versus crizotinib in untreated alk-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017; 377: 829-838.
- Pietras A, Katz AM, Ekstrom EJ, Wee B, Halliday JJ, Pitter KL , ve ark. Osteopontin-cd44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth. *Cell Stem Cell.* 2014; 14: 357-369.
- Pikor LA, Ramnarine VR, Lam S, Lam WL. Genetic alterations defining nslc subtypes and their therapeutic implications. *Lung cancer.* 2013; 82: 179-189.
- Planchard D, Besse B, Groen HJ, Souquet P-J, Quoix E, Baik CS , ve ark. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated brafv600e-mutant metastatic non-small cell lung cancer: An open-label, multicentre phase 2 trial. *The Lancet Oncology.* 2016; 17: 984-993.
- Planchard D, Smit EF, Groen HJ, Mazieres J, Besse B, Helland Å , ve ark. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated brafv600e-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: An open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology.* 2017; 18: 1307-1316.
- Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Semin Immunol.* 2015; 27: 237-248.
- Qin J, Zhang X, Tan B, Zhang S, Yin C, Xue Q , ve ark. Blocking p2x7-mediated macrophage polarization overcomes treatment resistance in lung cancer. *Cancer Immunology Research.* 2020; 8: 1426-1439.
- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine.* 2013; 19: 1423-1437.
- Rakaee M, Busund L-TR, Jamaly S, Paulsen E-E, Richardsen E, Andersen S , ve ark. Prognostic value of macrophage phenotypes in resectable non-small cell lung cancer assessed by multiplex immunohistochemistry. *Neoplasia.* 2019; 21: 282-293.
- Rangaswami H, Kundu GC. Osteopontin stimulates melanoma growth and lung metastasis through nik/meck1-dependent mmp-9 activation pathways. *Oncology reports.* 2007; 18: 909-915.
- Rao G, Wang H, Li B, Huang L, Xue D, Wang X , ve ark. Reciprocal interactions between tumor-associated macrophages and cd44-positive cancer cells via osteopontin/cd44 promote tumorigenicity in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 785-797.
- Rao J, Wang H, Ni M, Wang Z, Wang Z, Wei S , ve ark. Fstl1 promotes liver fibrosis by reprogramming macrophage function through modulating the intracellular function of pkm2. *Gut.* 2022; 71: 2539-2550.
- Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A , ve ark. Pembrolizumab versus chemotherapy for pd-l1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1823-1833.
- Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology.* 2011; 24: 1348-1359.
- Ren CX, Leng RX, Fan YG, Pan HF, Li BZ, Wu CH , ve ark. Intratumoral and peritumoral expression of cd68 and cd206 in hepatocellular carcinoma and their prognostic value. *Oncol Rep.* 2017; 38: 886-898.

- Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E , ve ark. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: An international agency for research on cancer (iarc) and world health organization (who) expert consensus proposal. *Modern Pathology*. 2018; 31: 1770-1786.
- Rittling SR. Osteopontin in macrophage function. *Expert Rev Mol Med*. 2011; 13: e15.
- Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba, II. Diagnosis and molecular classification of lung cancer. *Cancer Treat Res*. 2016; 170: 25-46.
- Rosai J. Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. *Laboratory investigation*. 2007; 87: 403-408.
- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E , ve ark. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for european patients with advanced egfr mutation-positive non-small-cell lung cancer (eurtac): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2012; 13: 239-246.
- Rud AK, Boye K, Øijordsbakken M, Lund-Iversen M, Halvorsen AR, Solberg SK , ve ark. Osteopontin is a prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2013; 13: 1-10.
- Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new international association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011; 6: 1496-1504.
- Russell PA, Barnett SA, Walkiewicz M, Wainer Z, Conron M, Wright GM , ve ark. Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new iaslc/ats/ers lung adenocarcinoma classification in stage iii (n2) patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2013; 8: 461-468.
- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. Nf-kappab mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol*. 1998; 141: 1083-1093.
- Schack L, Stapulionis R, Christensen B, Kofod-Olsen E, Skov Sørensen UB, Vorup-Jensen T , ve ark. Osteopontin enhances phagocytosis through a novel osteopontin receptor, the $\alpha\beta 2$ integrin. *The Journal of Immunology*. 2009; 182: 6943-6950.
- Schaper F, de Leeuw K, Horst G, Bootsma H, Limburg PC, Heeringa P , ve ark. High mobility group box 1 skews macrophage polarization and negatively influences phagocytosis of apoptotic cells. *Rheumatology*. 2016; 55: 2260-2270.
- Sedighzadeh SS, Khoshbin AP, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. A narrative review of tumor-associated macrophages in lung cancer: Regulation of macrophage polarization and therapeutic implications. *Translational lung cancer research*. 2021; 10: 1889.
- Sequist LV, Yang JC-H, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T , ve ark. Phase iii study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with egfr mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2023; 41: 2869-2876.
- Shang G-H, Jia C-Q, Tian H, Xiao W, Li Y, Wang A-H , ve ark. Serum high mobility group box protein 1 as a clinical marker for non-small cell lung cancer. *Respiratory medicine*. 2009; 103: 1949-1953.
- Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R , ve ark. Crizotinib in ros1-rearranged non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2014; 371: 1963-1971.
- Shen X, Hong L, Sun H, Shi M, Song Y. The expression of high-mobility group protein box 1 correlates with the progression of non-small cell lung cancer. *Oncology reports*. 2009; 22: 535-539.
- Shi L, Wang X. Role of osteopontin in lung cancer evolution and heterogeneity. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; 64: 40-47.

- Shiau DJ, Kuo WT, Davuluri GVN, Shieh CC, Tsai PJ, Chen CC , ve ark. Hepatocellular carcinoma-derived high mobility group box 1 triggers m2 macrophage polarization via a tlr2/nox2/autophagy axis. *Sci Rep.* 2020; 10: 13582.
- Shibanuma M, Mashimo J, Mita A, Kuroki T, Nose K. Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin-related polypeptide. *Eur J Biochem.* 1993; 217: 13-19.
- Shimosato Y, Hashimoto T, Kodama T, Kameya T, Suzuki A, Nishiwaki Y, Yoneyama T. Prognostic implications of fibrotic focus (scar) in small peripheral lung cancers. *The American journal of surgical pathology.* 1980; 4: 365-374.
- Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, Cantor H. Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol.* 2006; 7: 498-506.
- Shinohara ML, Kim HJ, Kim JH, Garcia VA, Cantor H. Alternative translation of osteopontin generates intracellular and secreted isoforms that mediate distinct biological activities in dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 7235-7239.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *The Journal of clinical investigation.* 2012; 122: 787-795.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S , ve ark. Identification of the transforming eml4-alk fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007; 448: 561-566.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11: 279-303.
- Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T , ve ark. First-line crizotinib versus chemotherapy in alk-positive lung cancer. *New England Journal of Medicine.* 2014; 371: 2167-2177.
- Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, Felip E, Soo RA, Camidge DR , ve ark. Lorlatinib in patients with alk-positive non-small-cell lung cancer: Results from a global phase 2 study. *The Lancet Oncology.* 2018; 19: 1654-1667.
- Soria JC, Tan DSW, Chiari R, Wu YL, Paz-Ares L, Wolf J , ve ark. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced alk-rearranged non-small-cell lung cancer (ascend-4): A randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2017; 389: 917-929.
- Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH , ve ark. Osimertinib in untreated egfr-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *New England journal of medicine.* 2018; 378: 113-125.
- Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: Reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of leukocyte biology.* 2004; 76: 509-513.
- Subraman V, Thiagarajan M, Malathi N, Rajan ST. Opn-revisited. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR.* 2015; 9: ZE10.
- Sumitomo K, Kurisaki A, Yamakawa N, Tsuchida K, Shimizu E, Sone S, Sugino H. Expression of a tgf-beta1 inducible gene, tsc-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett.* 2000; 155: 37-46.
- Sumitomo R, Hirai T, Fujita M, Murakami H, Otake Y, Huang CL. M2 tumor-associated macrophages promote tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Experimental and therapeutic medicine.* 2019; 18: 4490-4498.
- Sun K-K, Ji C, Li X, Zhang L, Deng J, Zhong N, Wu X-Y. Overexpression of high mobility group protein b1 correlates with the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells. *Molecular medicine reports.* 2013; 7: 1678-1682.
- Sun S, Zhang W, Cui Z, Chen Q, Xie P, Zhou C , ve ark. High mobility group box-1 and its clinical value in breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2015; 8: 413-419.
- Sun Y, Xu S. Tumor-associated cd204-positive macrophage is a prognostic marker in clinical stage i lung adenocarcinoma. *BioMed research international.* 2018; 2018.

- Sundaram GM, Ismail HM, Bashir M, Muhuri M, Vaz C, Nama S , ve ark. Egf hijacks mir-198/fstl1 wound-healing switch and steers a two-pronged pathway toward metastasis. *J Exp Med*. 2017; 214: 2889-2900.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71: 209-249.
- Tabata C, Kanemura S, Tabata R, Masachika E, Shibata E, Otsuki T-I , ve ark. Serum hmgbl as a diagnostic marker for malignant peritoneal mesothelioma. *Journal of clinical gastroenterology*. 2013; 47: 684-688.
- Taguchi A, Blood DC, Del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W , ve ark. Blockade of rage–amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000; 405: 354-360.
- Tan Y, Zhao L, Yang Y-G, Liu W. The role of osteopontin in tumor progression through tumor-associated macrophages. *Frontiers in Oncology*. 2022; 12: 953283.
- Terrando N, Monaco C, Ma D, Foxwell BM, Feldmann M, Maze M. Tumor necrosis factor- α triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 20518-20522.
- Tian S, Zhang L, Tang J, Guo X, Dong K, Chen S-Y. Hmgbl exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating m1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2015; 308: F69-F75.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y , ve ark. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of thoracic oncology*. 2011; 6: 244-285.
- Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*. 2012; 25: S18-S30.
- Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: Relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol*. 2013; 31: 992-1001.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 world health organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015; 10: 1240-1242.
- Travis WD, Nicholson AG, Geisinger KR, Brambilla E. Tumors of the lower respiratory tract. *American Registry of Pathology*; 2019.
- Travis WD. Lung cancer pathology: Current concepts. *Clinics in chest medicine*. 2020; 41: 67-85.
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007; 99: 1441-1454.
- Tsukamoto M, Imai K, Ishimoto T, Komohara Y, Yamashita Yi, Nakagawa S , ve ark. Pd-1l expression enhancement by infiltrating macrophage-derived tumor necrosis factor- α leads to poor pancreatic cancer prognosis. *Cancer science*. 2019; 110: 310-320.
- Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers AF. Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (met). *J Cell Biochem*. 2000; 78: 465-475.
- Tuck AB, Hota C, Wilson SM, Chambers AF. Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of egf receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene*. 2003; 22: 1198-1205.
- Urquidi V, Sloan D, Kawai K, Agarwal D, Woodman AC, Tarin D, Goodison S. Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 61-74.

- Vitale I, Manic G, Coussens LM, Kroemer G, Galluzzi L. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. *Cell metabolism*. 2019; 30: 36-50.
- Wang L, Jia Q, Chu Q, Zhu B. Targeting tumor microenvironment for non-small cell lung cancer immunotherapy. *Chin Med J Pulm Crit Care Med*. 2023; 1: 18-29.
- Wang R, Zhang J, Chen S, Lu M, Luo X, Yao S , ve ark. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung cancer*. 2011a; 74: 188-196.
- Wang X-h, Zhang S-y, Shi M, Xu X-p. Hmgb1 promotes the proliferation and metastasis of lung cancer by activating the wnt/ β -catenin pathway. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2020; 19: 1533033820948054.
- Wang XJ, Zhou SL, Fu XD, Zhang YY, Liang B, Shou JX , ve ark. Clinical and prognostic significance of high-mobility group box-1 in human gliomas. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015; 9: 513-518.
- Wang XM, Li J, Yan MX, Liu L, Jia DS, Geng Q , ve ark. Integrative analyses identify osteopontin, lamb3 and itgb1 as critical pro-metastatic genes for lung cancer. *PLoS One*. 2013; 8: e55714.
- Wang Y-J, Wang Q-W, Yu D-H, Song C-K, Guo Z-X, Liu X-P , ve ark. Osteopontin improves sensitivity to tyrosine kinase inhibitor in lung adenocarcinoma in vitro by promoting epidermal growth factor receptor phosphorylation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2021; 147: 3245-3254.
- Wang Y, Yan W, Lu X, Qian C, Zhang J, Li P , ve ark. Overexpression of osteopontin induces angiogenesis of endothelial progenitor cells via the $\alpha v\beta 3$ /pi3k/akt/enos/no signaling pathway in glioma cells. *European journal of cell biology*. 2011b; 90: 642-648.
- Wang Y, Cao K, Zong M, Yuan S, Zhang N, Liu Y. Mutual promotion of co-condensation of kras g-quadruplex and a well-folded protein hmgb1. *Nucleic Acids Res*. 2024; 52: 288-299.
- Welsh TJ, Green RH, Richardson D, Waller DA, O'Byrne KJ, Bradding P. Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology*. 2005; 23: 8959-8967.
- Williams CB, Yeh ES, Soloff AC. Tumor-associated macrophages: Unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ breast cancer*. 2016; 2: 15025.
- Wong SK, Iams WT. Front line applications and future directions of immunotherapy in small-cell lung cancer. *Cancers*. 2021; 13: 506.
- Wood DE, Kazerooni EA, Baum SL, Eapen GA, Ettinger DS, Hou L , ve ark. Lung cancer screening, version 3.2018, nccn clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2018; 16: 412-441.
- Wu D, Ding Y, Wang S, Zhang Q, Liu L. Increased expression of high mobility group box 1 (hmgb1) is associated with progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*. 2008; 216: 167-175.
- Wu K, Lin K, Li X, Yuan X, Xu P, Ni P, Xu D. Redefining tumor-associated macrophage subpopulations and functions in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2020; 11: 1731.
- Wu T, Dai Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett*. 2017; 387: 61-68.
- Wu XJ, Chen YY, Gong CC, Pei DS. The role of high-mobility group protein box 1 in lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018; 119: 6354-6365.
- Wu Y-L, Zhou C, Hu C-P, Feng J, Lu S, Huang Y , ve ark. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring egfr mutations (lux-lung 6): An open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2014; 15: 213-222.
- Xu T, Jiang L, Wang Z. The progression of hmgb1-induced autophagy in cancer biology. *Oncotargets Ther*. 2019; 12: 365-377.

- Yang S, Zhang Z, Wang Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2019; 12: 1-11.
- Yang W, Wu Y, Wang C, Liu Z, Xu M, Zheng X. Fstl1 contributes to tumor progression via attenuating apoptosis in a akt/gsk-3beta - dependent manner in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomark*. 2017; 20: 75-85.
- Yang X, Liu Z, Zhou J, Guo J, Han T, Liu Y , ve ark. Spp1 promotes the polarization of m2 macrophages through the jak2/stat3 signaling pathway and accelerates the progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Int J Mol Med*. 2024; 54.
- Yao Z, Zhang J, Zhang B, Liang G, Chen X, Yao F , ve ark. Imatinib prevents lung cancer metastasis by inhibiting m2-like polarization of macrophages. *Pharmacol Res*. 2018; 133: 121-131.
- Yasinska IM, Goncalves Silva I, Sakhnevych SS, Ruegg L, Hussain R, Siligardi G , ve ark. High mobility group box 1 (hmgb1) acts as an "alarmin" to promote acute myeloid leukaemia progression. *Oncoimmunology*. 2018; 7: e1438109.
- Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S , ve ark. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *Journal of thoracic oncology*. 2019; 14: 377-407.
- Ye J, Liu H, Xu ZL, Zheng L, Liu RY. Identification of a multidimensional transcriptome prognostic signature for lung adenocarcinoma. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2019; 33: e22990.
- Yeung MY, Ding Q, Brooks CR, Xiao S, Workman CJ, Vignali DA , ve ark. Tim-1 signaling is required for maintenance and induction of regulatory b cells. *Am J Transplant*. 2015; 15: 942-953.
- Yi C, Zhang X, Li H, Chen G, Zeng B, Li Y , ve ark. Ephb4 regulates the proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma through the hmgb1/nf-kappab signalling pathway. *J Cancer*. 2021; 12: 5999-6011.
- Yuan A, Hsiao Y-J, Chen H-Y, Chen H-W, Ho C-C, Chen Y-Y , ve ark. Opposite effects of m1 and m2 macrophage subtypes on lung cancer progression. *Scientific reports*. 2015; 5: 14273.
- Yuan Q, Gu J, Zhang J, Liu S, Wang Q, Tian T , ve ark. Myd88 in myofibroblasts enhances colitis-associated tumorigenesis via promoting macrophage m2 polarization. *Cell reports*. 2021; 34.
- Yuan Y, Jiang Y-C, Sun C-K, Chen Q-M. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications. *Oncology reports*. 2016; 35: 2499-2515.
- Zhang B, Yao G, Zhang Y, Gao J, Yang B, Rao Z, Gao J. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. *Clinics*. 2011; 66: 1879-1886.
- Zhang H, Guo M, Chen JH, Wang Z, Du XF, Liu PX, Li WH. Osteopontin knockdown inhibits alphav,beta3 integrin-induced cell migration and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by inducing autophagy and inactivating the pi3k/akt/mtor pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2014a; 33: 991-1002.
- Zhang J, Kou Y-B, Zhu J-S, Chen W-X, Li S. Knockdown of hmgb1 inhibits growth and invasion of gastric cancer cells through the nf-kb pathway in vitro and in vivo. *International journal of oncology*. 2014b; 44: 1268-1276.
- Zhang L, Han J, Wu H, Liang X, Zhang J, Li J , ve ark. The association of hmgb1 expression with clinicopathological significance and prognosis in hepatocellular carcinoma: A meta-analysis and literature review. *PloS one*. 2014c; 9: e110626.
- Zhang QY, Wu LQ, Zhang T, Han YF, Lin X. Autophagy-mediated hmgb1 release promotes gastric cancer cell survival via rage activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Oncol Rep*. 2015; 33: 1630-1638.

- Zhang Y, Du W, Chen Z, Xiang C. Upregulation of pd-l1 by spp1 mediates macrophage polarization and facilitates immune escape in lung adenocarcinoma. *Experimental cell research*. 2017; 359: 449-457.
- Zhang Y, Ren JS, Huang HY, Shi JF, Li N, Zhang Y, Dai M. International trends in lung cancer incidence from 1973 to 2007. *Cancer Med*. 2018a; 7: 1479-1489.
- Zhang Y, Xu X, Yang Y, Ma J, Wang L, Meng X, ve ark. Deficiency of follistatin-like protein 1 accelerates the growth of breast cancer cells at lung metastatic sites. *Journal of Breast Cancer*. 2018b; 21: 267-276.
- Zhao W, Han HB, Zhang ZQ. Suppression of lung cancer cell invasion and metastasis by connexin43 involves the secretion of follistatin-like 1 mediated via histone acetylation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011; 43: 1459-1468.
- Zheng X, Weigert A, Reu S, Guenther S, Mansouri S, Bassaly B , ve ark. Spatial density and distribution of tumor-associated macrophages predict survival in non-small cell lung carcinoma. *Cancer research*. 2020; 80: 4414-4425.
- Zhou C, Wu Y-L, Chen G, Feng J, Liu X-Q, Wang C , ve ark. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced egfr mutation-positive non-small-cell lung cancer (optimal, ctong-0802): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *The lancet oncology*. 2011; 12: 735-742.
- Zhou Q, Xian M, Xiang S, Xiang D, Shao X, Wang J , ve ark. All-trans retinoic acid prevents osteosarcoma metastasis by inhibiting m2 polarization of tumor-associated macrophages. *Cancer Immunol Res*. 2017; 5: 547-559.
- Zhou X, Xiao X, Huang T, Du C, Wang S, Mo Y , ve ark. Epigenetic inactivation of follistatin-like 1 mediates tumor immune evasion in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7: 16433-16444.
- Zhu B, Suzuki K, Goldberg HA, Rittling SR, Denhardt DT, McCulloch CA, Sodek J. Osteopontin modulates cd44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through g-protein-coupled receptors: Evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. *Journal of cellular physiology*. 2004; 198: 155-167.
- Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, Arora P, Glogauer M, McCulloch C, Sodek J. Intracellular osteopontin is an integral component of the cd44-erm complex involved in cell migration. *Journal of cellular physiology*. 2000; 184: 118-130.
- Zou X-L, Wang C, Liu K, Nie W, Ding Z-Y. Prognostic significance of osteopontin expression in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *Molecular and clinical oncology*. 2015; 3: 633-638.
- Zuo Z, Che X, Wang Y, Li B, Li J, Dai W , ve ark. High mobility group box-1 inhibits cancer cell motility and metastasis by suppressing activation of transcription factor creb and nwas expression. *Oncotarget*. 2014; 5: 7458.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğba	Uyruğu	
Soyadı	KARAMAN MERCAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Karatay Lisesi	2008
Lisans	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Programı	2017
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Programı	2024

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Arş.Gör.	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2017-devam

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	78,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Akciğer Adenokarsinomlarında Follistatin-Like Protein 1, High Mobility Group Box1, Osteopontin Proteinlerinin Değerlendirilmesi	TÜBİTAK-1002 Proje No:123S107	2023-2024
Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomlarında Makrofaj Aktivasyonunda Etkili Follistatin-Like Protein 1, High Mobility Group Box1, Osteopontin Proteinleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi-BAP Proje no: TDK-2022-5563	2022-2024
Beta Talasemi Hastalarında Yüksek Fetal Hemoglobine Neden Olan Genetik Değişikliklerin Araştırılması	Yozgat Bozok Üniversitesi BAP	2019-2022
Beta Talasemi Majör Hastalarında Modifiye Edici SALL2 Geni Bağlanma Motifinde Mutasyon Taranması	Akdeniz Üniversitesi-BAP Proje no: TYL-2016-1232	2016-2017
Beta Talasemi Majör Hastalarında TAL1 Geni Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi ve HbF ile İlişkisinin Araştırılması	Akdeniz Üniversitesi -BAP Proje no: TYL-2019-4573	2019-2021
ANTALYADA BETA TALASEMİ MAJÖR HASTALARINDA GAMMA GLOBİN PROMOTOR BÖLGE MUTASYONLARI VE HbF İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI	Akdeniz Üniversitesi -BAP Proje no:TYL-2019-4566	2019-2021

Burslar ve Ödüller:

Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü İkinciliği Ödülü

Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Fakülte Üçüncülüğü Ödülü

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. **Karaman Mercan Tuğba**, Karaüzüm Sibel, Iltar Utku, Yücel Orhan Kemal, Gülkesen Kemal Hakan, Yakut Uzuner Sezin (2023). Loss of Y Chromosome in Bone Marrow Cells with Hematologic Malignancies: A Retrospective Study. UHOD-Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, 0(4), 221-226., Doi: 10.4999/uhod.237227
2. Arıkan Yunus, Bilgen Türker, Mıhçı Ercan, Duman Özgür, **Karaman Mercan Tuğba**, Keser İbrahim (2022). FMR1 Gene Mutation Analysis and CGG Repeat Number Distribution from a Single Center. Gazi University Faculty of Medicine, 33, 369-374., Doi: 10.12996/gmj.2022.83
3. **Karaman Mercan Tuğba**, Altıok Clark Özden, Erkal Özgür, Nur Banu, Mıhçı Ercan, Karaman Birsan, Şenol Abdullah Utku, Karaüzüm Sibel (2021). Coexistence of a Homozygous Chromosome 4q35.2 Deletion and Hidden IQSEC2 Pathogenic Variant in a Child with Intellectual Disability. Cytogenetic and Genome Research, 161, 7, Doi: 10.1159/000515368

Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler:

1. Health Sciences Research in the Globalizing World, Bölüm adı:(A New Strategy in Diabetes) (2018)., Moballeghe Asef, **Karaman Mercan Tuğba**, Keser İbrahim, St.Kliment Ohridski University Press, Editör:Elena Alexandrova, Nelya Lukpanovna Shapekova, Bilal Ak, Fügen Özcanaslan, Basım sayısı:1, ISBN:978-954-07-4525-1, İngilizce(Bilimsel Kitap)

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. **Karaman Mercan Tuğba**, Çiftçi Vildan, Toylu Aslı, Nur Banu, Altıok Clark Özden, Karaüzüm Sibel (2024). A Case with Angelman Syndrome Carried de novo der(15q;15q) By de novo Paternal Uniparental Disomy. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi, 11, 40-46., Doi: 10.47572/muskutd.1349887
2. Keser İbrahim, **Karaman Mercan Tuğba**, Bilgen Türker, Küpesiz Osman Alphan, Arıkan Yunus, Canatan Duran (2021). Investigation of Alpha Globin Gene Mutations by Complementary Methods in Antalya. Eastern Journal of Medicine, 26(1), 117-122., Doi: 10.5505/ejm.2021.04796

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında

1. **Karaman Mercan Tuğba**, Altıok Clark Özden, İltar Utku, Yücel Orhan Kemal, Karaüzüm Sibel (2021). Hematolojik Malignansilerle Y Kromozom Kaybı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. XVII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 52(3), 188-189. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
2. **Karaman Mercan Tuğba**, Altıok Clark Özden, Toylu Aslı, Nur Banu, Mihçi Ercan, Karaüzüm Sibel (2021). Paternal Uniparental Dizomiyle Ortaya Çıkan Angelman Sendromlu Olgusu. XVII. TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK KONGRESİ, 52(3), 328-329. (Özet Bildiri/Poster)
3. Embel Merve Sultan, **Karaman Mercan Tuğba**, Arıkan Yunus, Kurtoglu Erdal (2021). Kontrol Grubunda Novel Bir Mutasyon, Ne Yapmalı? XVII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 52(3), 379380. (Özet Bildiri/Poster)
4. Sibel Berker Karaüzüm, **Tuğba Karaman Mercan**, Vildan Çiftçi (2021). Antalya'daki Ailesel ALS Olguları. Korkut Yaltkaya XIV. Klinik Nörofizyoloji Sempozyumu Nadir Hastalıklar Olarak ALS, 205-221(Tam metin/sözlü sunum)
5. **Karaman Mercan Tuğba**, Altıok Clark Özden, Nur Banu, Mihçi Ercan, Karaüzüm Sibel (2019). Homozygous terminal deletion on 4q35.2 in a child with developmental disability and healthy parents with heterozygous deletion in the same region. Erciyes Tıp Genetik Günleri (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)
6. **Karaman Tuğba**, Arıkan Yunus, Bilgen Türker, Kurtoglu Erdal, Keser İbrahim (2017). Beta talasemi majör hastalarında modifiye edici SALL2 geni

bağlanma motifinde mutasyon taranması. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

7. Arıkan Yunus, Bilgen Türker, **Karaman Tuğba**, Canatan Duran, Keser İbrahim (2015). Antalya ve Çevresinde Alfa Globin Gen Mutasyonlarının Araştırılması. 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi (Özet Bildiri/Poster)

