

**EZGİ DİNÇER**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL-2019**



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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**KOLOREKTAL KANSERLERDE HLA-G'NİN DOĞAL  
ÖLDÜRÜCÜ İNHİBİTÖR RESEPTÖRLER İLE  
ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

**EZGİ DİNÇER**

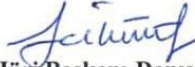
**DANIŞMAN  
PROF. DR. FATMA SAVRAN OĞUZ**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2019**

**TEZ ONAYI****YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans öğrencisi **Ezgi DİNÇER** tarafından Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'un danışmanlığında hazırlanan "**Kolorektal Kanselerde HLA-G'nin Doğal Öldürücü İnhibitör Reseptörler ile Etkileşiminin İncelenmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından. 26/06/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



**Jüri Başkanı-Danışman**  
Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. İnan YAYLIM  
İstanbul Üniversitesi, Aziz SANCAR DETAE  
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof. Dr. Filiz AYDIN  
Bilim Üniversite Tıp Fakülte  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI  
İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Doç. Dr. Kürşat ÖZDİLLİ  
Medipol Üniversite Tıp Fakülte  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

**BEYAN**

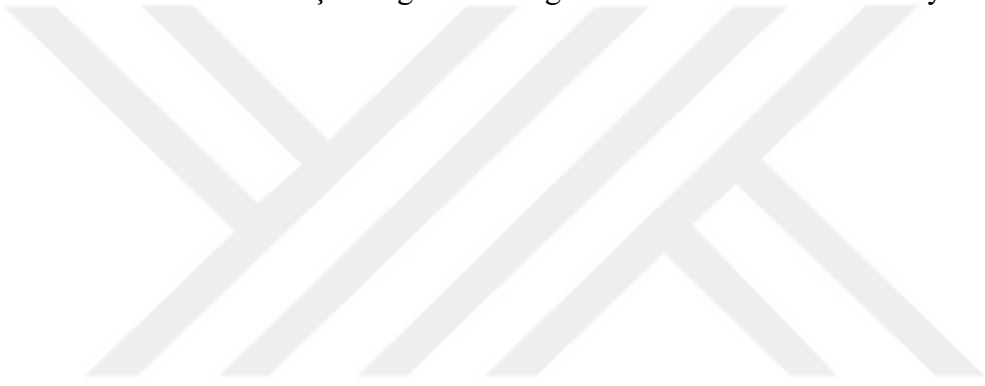
Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları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

Ezgi DİNÇER (İmza)



## İTHAF

Canım aileme ve çok değerli ve sevgili Kaban dostlarına ithaf ediyorum...



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamız sırasında değerli bilgi, deneyimleri ve hoşgörüsü ile bana her konuda destek olan, çalışmamızın en iyi şartlarda tamamlanabilmesi için tüm imkan ve olanakları sağlayan ve öğrencisi olduğum için her zaman kendimi şanslı hissettiğim kıymetli danışmanım Tıbbi Biyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ'a, fikir ve deneyimleri ile yardımlarını ve desteğini hiç esirgemeyen, tez çalışmamıza çok büyük katkıları olan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya, tezimin her aşamasının hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen, daha emin adımlarla ilerlemem için önüme ışık tutan, deneylerim ve örneklerim için beni yönlendiren çok sevdiğim kıymetli seroloji laboratuvarı süpervizörüm Bio. Sebahat USTA AKGÜL'e, çalışmada kullandığımız materyallerin toplanmasında desteklerini esirgemediği ve tüm uğraşları için Doç. Dr. Kıvanç Derya PEKER'e, sonuçlarımızın istatistiki değerlendirmelerinde çok büyük destek sağlayan, güler yüzü ve enerjisi ile hep yanımda olan Dr. Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ'ye, tez çalışmamın düzen kısmında desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşım Çağla YAVUZ'a, güler yüzleri ve pozitif enerjileri ile benden desteklerini hiç esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Seroloji Laboratuvarı çalışanlarına, çalışmalarım süresince benimle sabahlayan, maddi-manevi tüm destekleriyle her zaman yanımda olan ve hayatın bana sunduğu en büyük ve en güzel şanslarımdan biri olan canım annem Gönül AKGEDİK'e, beni sabırla dinleyen biricik kardeşim Berkay DİNÇER ve canım babam Cem İlyas DİNÇER'e, verdikleri tüm desteklerle bana asla 'yalnız' olmadığımı hissettirerek, bu yolda her koşulda ve her zaman kendimi hep güvende hissetmemi sağlayan sevgili Özkan GÜLKÖKÜ ve Nimet ERENLER GÜLKÖKÜ'ne, içlerinden biri olabilmekten onur duyduğum ve hep duyacağım saygıdeğer CBN Scholae ailesine teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23910

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser ve Kolorektal Kanser Oluşum Mekanizmaları .....	3
2.2. Kanser ve İmmünite İlişkisi .....	6
2.3. İmmün Sistem ve İmmün Yanıt .....	9
2.3.1. Doğal (Spesifik-olmayan) İmmünite .....	10
2.3.2. Edinsel (Spesifik) İmmünite .....	11
2.4. İmmün Yanıtta Rol Oynayan Hücreler .....	11
2.4.1. Lenfoid Hücreler .....	13
2.4.1.1. B ve T Lenfositler .....	14
2.4.1.2. Doğal Öldürücü (Natural Killer-NK) Hücreler.....	16
2.4.2. Myeloid Hücreler .....	18
2.5. İmmün Yanıtta Rol Oynayan Hücrelerin Kanserle Olan İlişkisi .....	19
2.6. HLA ve Kanser .....	23
2.6.1. İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) ve Kanser Üzerindeki Rolü .....	23
2.6.2. HLA-G'nin Kanser Türlerine Göre Dokular Üzerindeki Dağılımı .....	27
2.7. NK Hücreleri ve KIR Reseptörünün Kanserli Dokular Üzerindeki Etkisi.....	31
2.8. İmmünohistokimya Yöntemi .....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
3.1. Çalışmanın Kurgusu.....	37

3.2. GEREÇLER.....	37
3.2.1. Hasta Grubu .....	37
3.2.2. Kontrol Grubu .....	38
3.2.3. Çalışmada Kullanılan Genel Cihazlar .....	38
3.2.4. Çalışmada Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler .....	39
3.3. YÖNTEM .....	40
3.3.1. Örneklerin Toplanması .....	40
3.3.2. ELISA Yöntemi Çalışma Prensibi .....	40
3.3.2.1. Kullanılan Kitler.....	41
3.3.2.2. Kullanılan Solüsyonlar.....	41
3.3.2.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....	42
3.3.2.4. ELISA Test Aşamaları .....	42
3.3.3. İmmünohistokimya Yöntemi Çalışma Prensibi .....	45
3.3.3.1. Kullanılan Monoklonal Antikorlar.....	45
3.3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar.....	45
3.3.3.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....	46
3.3.3.4. İmmünohistokimya Test Prosedürü .....	46
3.3.4. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	51
4.1. Demografik Veriler .....	51
4.2. HLA-G İfadesi İncelemesi .....	52
4.2.1. Kolorektal Kanserli ve Sağlıklı Dokularda HLA-G İmmün Boyaması.....	52
4.2.2. HLA-G'nin Klinikopatolojik Parametreler ile Korelasyonu .....	55
4.3. Öldürücü Hücre İmmünglobulin Benzeri Reseptör (Killer Cell İmmünoglobulin like Receptor-KIR) İmmün Boyaması İncelemesi.....	57
4.3.1. KRK ve Sağlıklı Kontrol Grubu Arasındaki KIR İmmün Boyanma Farklılıkları .....	57
4.3.2. KIR İfadesinin Klinikopatolojik Parametreler ile Korelasyonu .....	60
4.4. Serum sHLA-G Seviyeleri İncelenmesi.....	65
4.4.1. Kolorektal Kanserli Hastaların ve Sağlıklı Kontrollerin Serumlarındaki sHLA-G İfade Seviyesi.....	65
4.5. KIR, HLA-G ve sHLA-G İfade Seviyeleri ve Değerlerinin Birbiri ile Karşılaştırılması .....	67



5. TARTIŞMA .....	70
KAYNAKLAR .....	82
GÖNÜLLÜ ONAY FORMU .....	102
ETİK KURUL KARARI .....	103
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	104
ÖZGEÇMİŞ .....	105



## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Standartların Hazırlanma Oranları .....	43
Tablo 4-1: Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş ve Cinsiyet Özelliklerine Göre Karşılaştırması .....	51
Tablo 4-2: Hasta Grubu Klinikopatolojik Veri Skorları .....	52
Tablo 4-3: HLA-G İfadesinin Hasta ve Kontrol Grubu Üzerindeki Dağılımı.....	54
Tablo 4-4: Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G İfade Pozitifliği .....	55
Tablo 4-5: Kanserin derecesi ve HLA-G İfadesi Arasındaki Anlamlılık .....	56
Tablo 4-6: KRK'li Grupta HLA-G İfadesi ile Klinikopatolojik Parametreler Arasındaki İlişki .....	56
Tablo 4-7: Hasta ve Kontrol Gruplarındaki KIR İfade Pozitifliği.....	58
Tablo 4-8: KIR İfadesinin Hasta ve Kontrol Grubu üzerindeki Dağılımı .....	59
Tablo 4-9: Hastaların kanser evrelerine göre dağılımı .....	60
Tablo 4-10: Kanserin derecesi ve KIR İfadesi Arasındaki Anlamlılık.....	61
Tablo 4-11: Kanser Evresine Göre KIR İfadesi Dağılımı .....	63
Tablo 4-12: KIR ifadesi ile Klinikopatolojik Parametrelerin Korelasyonu.....	64
Tablo 4-13: Çalışılan Hasta ve Sağlıklı Kontroller Arasındaki sHLA-G Anlamlılığı ...	66
Tablo 4-14: Hasta Grubunda sHLA-G Seviyeleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması .....	67
Tablo 4-15: HLA-G ve KIR Pozitiflik ve Negatiflik Değerleri.....	68
Tablo 4-16: Hasta Grubundaki sHLA-G Seviyelerinin KIR ve HLA-G Belirteçleri ile İlişkisi.....	69

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kalın bağırsak ve rektum kısımları .....	3
Şekil 2-2: Çeşitli dış etkenler sonucu meydana gelen DNA hasarı .....	4
Şekil 2-3: Kansere neden olan çeşitli etkenler .....	5
Şekil 2-4: İmmün sistem ve elemanları şematik gösterimi .....	7
Şekil 2-5: NK hücrelerinin hücre yüzey reseptörü HLA Sınıf I ifadesine göre baskılanması .....	8
Şekil 2-6: İmmünite ve immün sistem hücreleri .....	9
Şekil 2-7: Kök hücre kaynaklı bağışıklık hücreleri .....	13
Şekil 2-8: Tümör hücresi ve T lenfositleri arasındaki etkileşim .....	15
Şekil 2-9: NK Hücre İnhibitör ve Aktivatör Reseptörleri .....	17
Şekil 2-10: T ve B Hücre yanıtına neden olan ASH .....	20
Şekil 2-11: HLA gruplarının 6. kromozom üzerinde konumlandığı bölgeler .....	24
Şekil 2-12: HLA-G'nin bağlantı kurduğu immün efektör hücreler ve reseptörler .....	28
Şekil 2-13: KIR reseptör ve ligandları .....	32
Şekil 3-1: Çalışmanın Kurgusu .....	37
Şekil 3-2: Kullanılan ELISA kiti ve hasta serumları .....	41
Şekil 3-3: ELISA çalışmasında standart solüsyonun seyreltilmesi .....	43
Şekil 3-4: Standartların Hazırlanması .....	44
Şekil 3-5: IHK çalışması yapılan hasta doku kesitleri .....	47
Şekil 3-6: IHK Testinden Görüntüler .....	49
Şekil 4-1: Kolorektal kanserli grupta HLA-G İfadesinin Dağılımı .....	53
Şekil 4-2: Kolorektal kanserli grupta HLA-G İfadesinin Pozitiflik Derecelerine Göre Dağılımı .....	53
Şekil 4-3: KRK'li ve sağlıklı dokularda pozitif ve negatif HLA-G boyanması .....	54
Şekil 4-4: Kanser evresi ve HLA-G ifade dağılımı .....	57
Şekil 4-5: KRK'li Grupta KIR İfadesi Dağılımı .....	58
Şekil 4-6: KRK'li ve sağlıklı dokularda pozitif ve negatif KIR boyanması .....	59
Şekil 4-7: KRK'li dokuda heterojen KIR boyanması .....	60
Şekil 4-8: Evreye göre KIR ifadesi dağılımı .....	62
Şekil 4-9: Tümör derinliği ile KIR ifadesi arasındaki ilişki .....	65
Şekil 4-10: Hasta ve kontrol grubu serumlarındaki sHLA-G seviyeleri .....	66

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KRK	: Kolorektal Kanser
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
NK	: Doğal Öldürücü (Natural Killer)
IHK:	: İmmünohistokimya
TAA	: Tümör İlişkili Antijenler
KIR	: Öldürücü Hücre İmmünglobulin Benzeri Reseptör
ILT	: İmmünglobulin Benzeri Transkript
ASH	: Antijen Sunucu Hücre
CTL	: Sitotoksik T Lenfositleri
T <sub>H</sub>	: Yardımcı T Lenfositleri
MHC	: Majör Histokompabilite Kompleksi
IFN- $\gamma$	: İnterferon gama
IL-12	: İnterlökin-12
PNL	: Polimorfonükleer Lökositler
Ig	: İmmünglobulin
IgE	: İmmünglobulin E
TİL	: Tümörü Kuşatan (İnfiltr eden) Lenfositler
TAM	: Tümör İlişkili Makrofajlar
TGF- $\beta$	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TA	: Tümör Antijeni
TAA	: Tümör İlişkili Antijen
RCC	: Renal Hücre Karsinomu
CLL	: Kronik Lenfositik Lenfoma
ESCC	: Özefagus Skuamöz Hücreli Karsinom
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
IHK	: İmmünohistokimya
dH <sub>2</sub> O	: Distile Su
ABC	: Avidin-Biotin Enzim Kompleksi
LSAB	: Labeled Streptavidin-Biotin kompleksi
HRP	: Horse Radish Peroksidaz

AP	: Alkalin Fosfataz
FITC	: Fluorecein isothiocynate
TRITC	: Tetramethylrhodomin
PE	: Fikoeritrin
AO	: Akridin orange
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit



## ÖZET

Dinçer, E. Kolorektal Kanserlerde HLA-G'nin Doğal Öldürücü Yüzey Belirteci KIR ile Etkileşiminin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

İmmün sistem, konağı dış ve iç tehditlere karşı savunmakla görevli organize bir sistemdir. Tümör hücreleri de neticede kendi öz hücrelerimizdir ancak normal hücrelerden farklı olarak bazı yüzey antijenleri taşıyabilmekte ve bunlar immün sistem tarafından 'yabancı' olarak algılanıp immün yanıtı açabilmektedir. Çoğu kanser hücresi immüniteden kaçabilmek için yüzey antijenleri sentezlemezler ya da azaltırlar, bu nedenle de konakçı tarafından ayrıştırılamazlar. Etkili bir immün takip yüzey antijenleriyle birlikte insan lökosit antijen (human leukocyte antigen (HLA)) ifadesi de gerektirmektedir. Tümör hücrelerindeki HLA antijenleri farklılıkları bu hücrelerin, doğal öldürücü (NK) hücrelerden kaçışına sebep olan bir mekanizma olarak öne sürülmüştür.

Kolorektal kanser (KRK), HLA-G antijenlerinin hücre yüzeyinde artışı, NK hücre işlevlerinde bozulma ve immün sistemden kaçış gibi bireyin immün sisteminde çok sayıda değişikliklere neden olabilir. Bu durumun kötü prognoz üzerine etkisi olduğu sanılmaktadır. Çalışmamızda, periferik kan serumlarından ELISA yöntemi ile çözünebilir HLA-G (sHLA-G) seviyelerinin belirlenmesi ve tümörlü dokuda immünohistokimya (IHK) yöntemi aracılığıyla HLA-G ifadesinin kayıp ya da yokluğuna bakılması ve NK hücrelerinin öldürücü inhibitör reseptör (KIR) yüzey belirteçlerinin tümör dokusuna infiltrasyonuna bakılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, KRK'li hastalardaki HLA-G ve KIR belirteçleri ifadesinin artış gösterdiği gözlenmiş ve dolayısıyla KRK'de güçlü, bağımsız ve faydalı bir prognostik belirteç olabileceği düşünülmüştür. Hasta ve kontrol serumlarındaki sHLA-G seviyeleri arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Sonuçlarımız HLA-G ve KIR belirteçlerinin gelecekteki immünoterapi yaklaşımları için umut vaat edici bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: HLA-G, NK, KIR, İmmünojenite

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 23910

## ABSTRACT

Dincer E. Investigation of the Interaction of HLA-G with Natural Killer Surface Marker KIR in Colorectal Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Medical Biology Department. Istanbul. 2019

Immunity is an organized system that defends the host against external and internal threats. Tumour cells can carry some surface antigens unlike normal cells and they can be perceived as ‘unfamiliar’ cells, therefore this antigens might cause an immune response. Most cancer cells don’t express or reduce the expression of surface antigens to escape immunity, therefore they are not eliminated by the host. An efficient immune surveillance requires surface antigens along with the expression of human leukocyte antigen (HLA). The differences of HLA antigens in tumor cells have been suggested as a mechanism that causes tumor cells to escape from natural killer (NK) cells.

Colorectal cancer can cause poor prognosis and numerous changes in individual’s immune system like the increasement of HLA antigens in cell surface, the deterioration of NK cell function and escape from the immunity. In our study, we aimed to determine soluble HLA-G (sHLA-G) antigens by ELISA method from peripheral blood serum samples, to investigate the loss or absence of HLA-G expression in tumor tissue through immunohistochemistry (IHC) and the infiltration of KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptor) indicators on NK cell surface to the tumour tissue. As a result of this study, it was observed that the expression of HLA-G and KIR markers in patients with CRC increased and it might be a strong, independent and useful prognostic marker in CRC. We did not observe any difference between sHLA-G levels. Our results suggest that HLA-G and KIR markers may be a promising target for future immunotherapeutic approaches.

Key Words: HLA-G, NK, KIR, Immunogen

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 23910

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolorektal kanser (KRK), tüm kanser türleri içerisinde en yaygın üçüncü kanser türüdür. Dünyada yaklaşık her yıl 1 milyon insan bu kansere yakalanmaktadır ve kansere bağlı ölümler arasında üçüncü sırada yer almaktadır (1). Kolorektal kanser tedavilerindeki gelişmelere rağmen beş yıllık sağkalım oranı yaklaşık %65'tir. Kolorektal kanser, insan lökosit antijeni (human leukocyte antigen (HLA)) Sınıf I/II antijenlerinin kaybı ve immün sistemden kaçış, doğal öldürücü (natural killer (NK)) hücre fonksiyonlarında bozulma gibi bireyin immün sisteminde çok sayıda değişikliklere neden olabilir. Bu durumun kötü prognoz üzerine etkisi olduğu sanılmaktadır (2).

İmmün sistem, mükemmel şekilde işleyen, organizmanın varlığının devamını sağlamak için konağı dış (virüs, bakteri, parazit) ve iç (tümör hücresi) tehditlere karşı savunmakla görevli bir dizi hücre, sitokin ve proteinlerden oluşan organize bir sistemdir. İmmün sistem hücreleri, kendinden olan hücre ve doku sistemleriyle olmayanları ayırt edecek yetenekte düzenlenmiştir. Tümör hücresi de neticede kendi öz hücrelerimiz olmakla beraber, normal hücrelerden farklı olarak bazı yüzey antijenleri taşıyabilir ve bunlar immün sistem tarafından 'yabancı' olarak algılanıp immün yanıtı yol açabilir. Malign tümörlerin gelişimi yalnızca neoplastik transformasyonun değil aynı zamanda anormal hücreleri elimine etmede konakçı direncinin başarısızlığının da bir sonucudur. Fakat çoğu neoplastik hücre, bağışıklık hücrelerinden kaçabilmek için yüzey antijenleri ifade etmez, azaltır ya da artırır, bu nedenle bunlar yabancı olarak algılanmaz ve konakçı tarafından elimine edilemezler. Etkili bir immün takip tümör yüzey antijenleriyle birlikte HLA ifadesi de gerektirmektedir (3). Tümör hücrelerindeki HLA antijenlerinin ifade seviyelerindeki farklılıklar bu hücrelerin, doğal bağışıklıktaki NK hücrelerden ve edinsel bağışıklıktaki CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositlerden (CTL) ve CD4<sup>+</sup> yardımcı T lenfositlerden kaçışına sebep olan bir mekanizma olarak öne sürülmüştür (4-6).

CTL'ler kanserli hücreler üzerindeki HLA Sınıf I-ilişkili peptidleri tanırlar ve antijeni tanıdıktan sonra aktive olurlar. CD8<sup>+</sup>ler hücre yüzeyinde HLA antijenlerinin ifade edilip edilmemesine göre immün yanıtı düzenleyebilirler. Hücreler ifade edilişlerine bağlı olarak CTL'ler ile etkileşime geçip apoptoza uğrayabilir ya da bu



apoptozdan kaçabilirler (7). Tümör hücreleri tarafından ifade edilen tümör ilişkili antijenlerin (TAA), CD8<sup>+</sup>lere sunumunda HLA Sınıf I ifadesi gerektiğinden, HLA ifadesindeki azalma ya da onların tam kaybı tümörlerin immüniteden kaçışına yol açabilir (8, 9).

NK hücreleri, öldürücü hücre immünglobulin benzeri reseptör (KIR) ve ayrıca HLA-G spesifik reseptör ifade ederler. HLA-G, immünglobulin-benzeri transkriptlere (ILT) ve KIR gibi baskılayıcı reseptörlere bağlanarak, işlevini esas olarak NK'lara, T lenfositlerine ve antijen-sunan hücrelere (ASH) karşı kullanmaktadır (10). Geçtiğimiz yıllarda HLA-G'nin immünolojik işlevi üzerinde yapılan çalışmalar, HLA-G'nin NK üzerindeki etkisi konusuna yoğunlaşmıştır. HLA-G'nin KIR ile etkileşimi aracılığı ile NK hücre sitotoksitesinin baskılanmasında direkt bir rolü olduğu ortaya atılmaktadır (11).

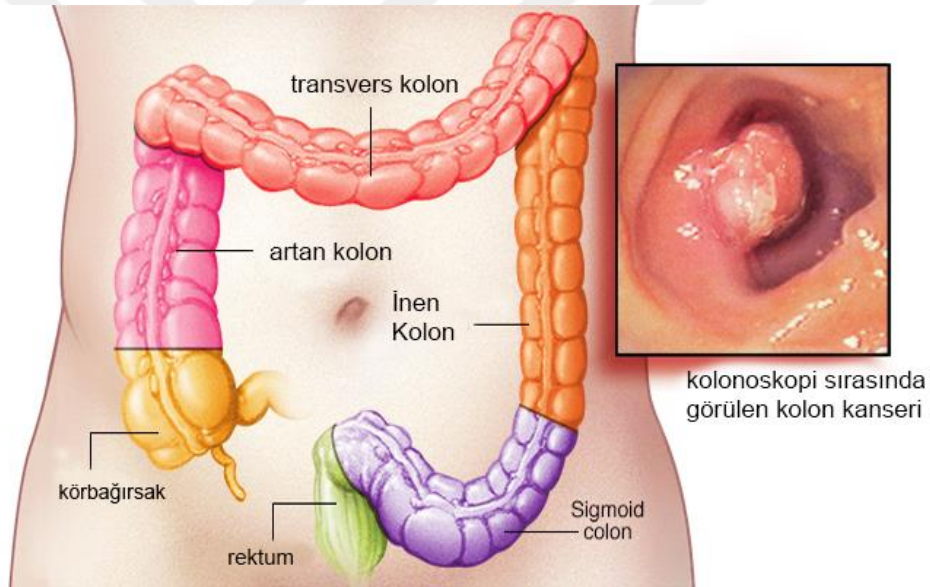
Çalışmamızda, hastaların periferik kan serumlarından ELISA yöntemi ile çözünebilir HLA-G (soluble HLA-G (sHLA-G)) seviyelerini belirlemeyi ve tümörlü ve sağlıklı doku biyopsileri üzerinde IHK yöntemi aracılığıyla HLA-G ifadesinin kayıp ya da yokluğuna bakmayı ve doğal immünitenin bir bileşeni olan NK hücrelerinin KIR yüzey belirteçlerinin tümör dokusuna infiltrasyonuna bakmayı amaçlamaktayız. Çalışma sonucunda bir tümör tanı belirteci olarak kolorektal kanserli hastaların tümör dokularındaki HLA-G protein ifadesinin artış göstermesi ve HLA-G'nin doğal bağışıklığın bir bileşeni olan NK hücrelerinin yüzey belirteçleri olan KIR'lar ile etkileşimi aracılığı ile NK hücre sitotoksitesinin baskılanması beklenmektedir.

İkincil öncelikli beklentilerimiz ise HLA-G molekülünün immün tolerant fonksiyonları ve kötücül hücrelere dönüşümdeki yüksek dereceli ifadesi nedeniyle gelecekteki immün terapötik yaklaşımlar için umut vaad edici bir hedef olmasıdır. Çalışmamız gerek doğal immünite gerekse edinsel immünitenin bileşenlerini içermesinden dolayı bir ilktir. Çalışmamızın KRK tümör immünojenitesi ve KRK'nin klinik önemi hakkında literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser ve Kolorektal Kanser Oluşum Mekanizmaları

Kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz ve kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren malign tümörlere denir. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlayıp vücudun diğer kısımlarını istila etmesi veya sıçraması ile yayılmaktadırlar. Kanserler; başlangıç yaşlarına, büyüme oranlarına, yayılımlarına, evrelerine ve tedaviye verdikleri tepkilere göre çeşitlilik göstermektedirler (12). Bununla birlikte, kolorektal kanser (KRK) kolondan veya kalın bağırsağın bir bölümü olan rektumdan gelişen bir kanser türüdür (Şekil 2-1).



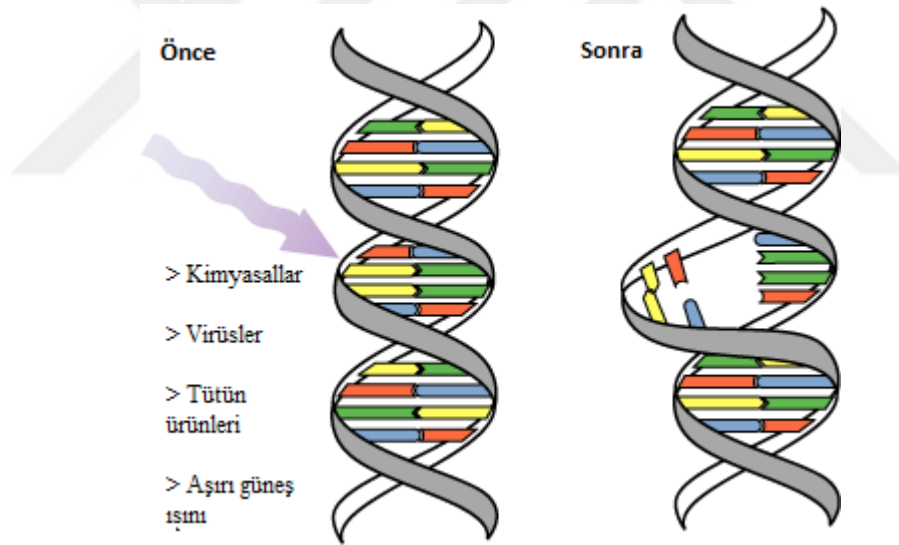
Şekil 2-1: Kalın bağırsak ve rektum kısımları

Bütün kanser tipleri vücudun temel yaşam ünitesi olan hücrelerimizden gelişmektedirler. Kanseri anlamak için öncelikle normal hücrelerin değişim göstererek nasıl habis yani kötücül tümörlere dönüştüğünü anlamak gerekmektedir.

Yaşamın ilk yıllarında hücreler daha hızlı bölünürken, ileriki yaşlarda bu hız yavaşlamaktadır. Fakat hücrelerin bu yetenekleri sınırlıdır yani sonsuz sayıda bölünememektedirler. Her hücrenin hayatı boyunca belirli bir bölünebilme sayısı mevcuttur. Sağlıklı bir hücre ne kadar süreyle bölüneceğini bilmektedir ve zamanı

geldiğinde biyolojik saati sona ermekte ve hücre yok edilmektedir. Buna apoptoz yani hücrenin programlı ölümü denilmektedir. Normalde vücudun sağlıklı ve düzgün çalışması için hücrelerin büyümesi, bölünmesi ve daha çok hücre üretmesine gereksinim vardır. Ancak bazen buna rağmen süreç doğru yoldan sapmakta ve yeni hücelere gerek olmadan hücreler bölünmeye devam etmektedir. Hücrenin normal sürecinden sapan kanser hücreleri, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar.

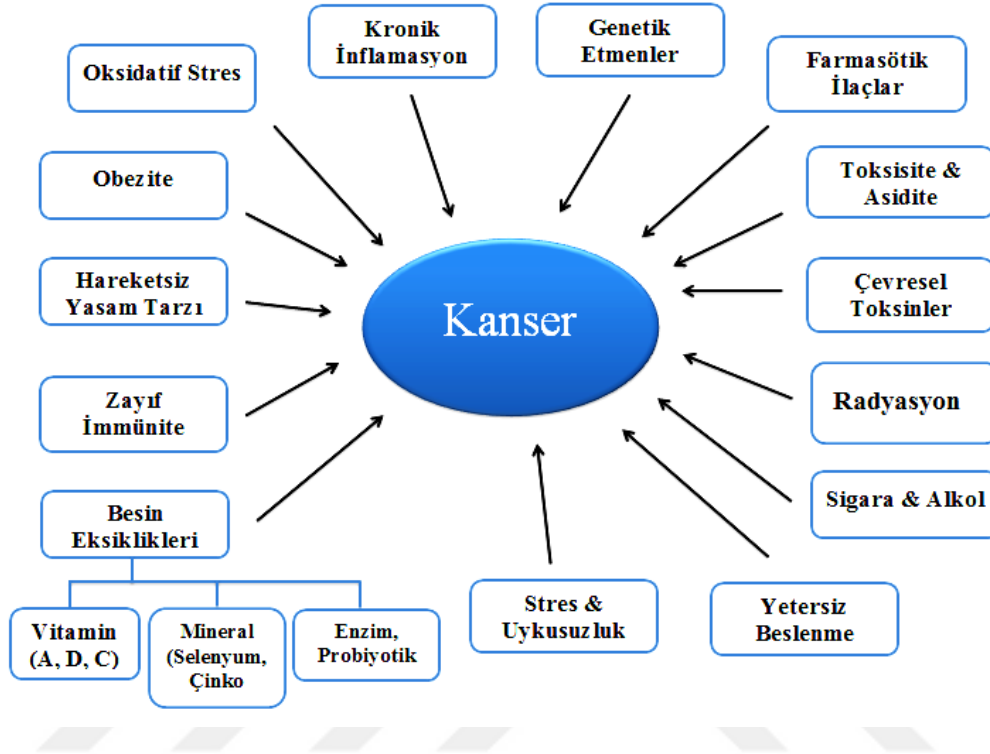
Hücrelerin merkezindeki çekirdek içerisinde, hücrenin ve organizmanın genetik bilgisinin saklandığı DNA, hücrenin normal fonksiyonlarını işletmesi için gereklidir. Çevresel etkenler (kimyasallar, virüsler, tütün ürünleri veya aşırı güneş ışını gibi) nedeniyle DNA’da hasar oluşabildiği gibi genetik veya epigenetik etkenler sebebiyle de oluşabilmektedir (Şekil 2-3). Hücrenin normal yaşam döngüsünde DNA hasarı olsa bile hücre ya bunu onarmakta ya da ölmektedir ancak kanserli hücrelerde hasar görmüş DNA onarılamayıp kontrolsüzce çoğalmaya başlamaktadır (Şekil 2-2).



**Şekil 2-2: Çeşitli dış etkenler sonucu meydana gelen DNA hasarı**

Kanserle ilişkili genomik değişimler tek bir nükleotidin yer değiştirmesinden büyük ölçüde kromozomların tekrar düzenlenişleri, çoğalmaları ve delesyonlarına kadar uzanmaktadır (12). Ancak diğer genetik hastalıklardan farklı olarak, genellikle somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar kansere yol açmaktadır. Kanser ile diğer genetik hastalıklar arasındaki önemli bir diğer fark, kanserin nadiren tek bir mutasyonla

oluşabilmesinden ziyade genellikle çok sayıda (6, 7, 8, 9) mutasyondan kaynaklanmaktadır.



Şekil 2-3: Kansere neden olan çeşitli etkenler

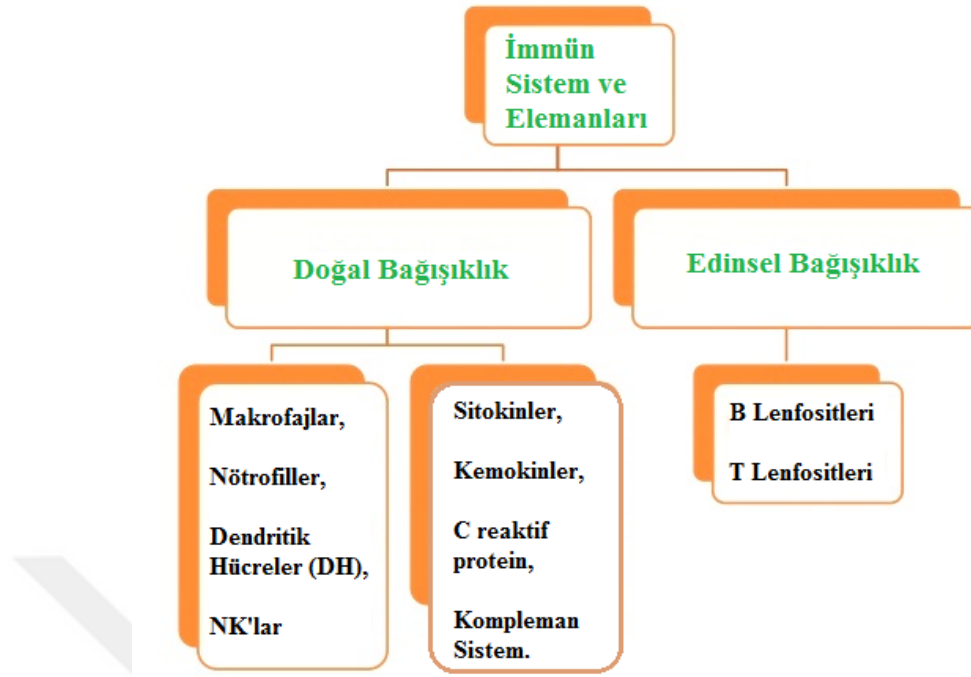
KRK tüm bu sebeplerin yanı sıra yaşlılık, obezite, aşırı alkol tüketimi, işlemden geçirilmemiş et çeşitlerinin tüketilmesi, sigara tüketimi ve fiziksel egzersiz eksikliği gibi risk faktörleri sonucunda da tetiklenebilmektedir. Ayrıca erkek bireylerde kadın bireylere oranla %30 daha sık görülmektedir (13). Her yaşta görülebilmesine rağmen en sık 50 yaşından sonra gözlenmektedir ve ortalama görülme yaşı 63'dür. Bugün KRK dünyadaki kanser çeşitlerinin %15'ini oluşturmaktadır. Amerika kıtasında her yıl ortalama 55.000 kişi, Avrupa kıtasında ise her yıl 100.000 kişi KRK'den yaşamını yitirmektedir (14). Dolayısıyla bu alanda yeni teşhis ve tedavi yöntemlerine gün geçtikçe daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

## 2.2. Kanser ve İmmünite İlişkisi

İmmün cevap, konağın kendisine yabancı olan maddeyi tanınması ve buna karşı yanıt vermesidir (15). Enfeksiyonlar ile tümörojenik hücrelere karşı savunmayı sağlayan hücre, doku ve moleküllerin toplamına immün sistem adı verilmektedir (16). İmmün sistem vücudu bakteri, virüs, mantar veya parazit gibi mikrocanlıların sebep olduğu enfeksiyonlara veya dolaylı yoldan bu enfeksiyonların ya da diğer bazı çevresel faktörlerin ve genetik etkenlerin sebep olabileceği kansere karşı korumaktadır (17). Bu olay genel olarak vücudun hasar görmüş hücrelere veya enfeksiyona karşı verdiği bağışık reaksiyondur. Bu nedenle bazen immün cevap olarak adlandırılır. İmmün sistem kanser hastaları için birçok şekilde önemlidir çünkü;

- Kanser immün sistemi zayıflatabilir,
- Kanser tedavisi immün sistemi zayıflatabilir,
- İmmün sistem kanserle savaşmaya yardımcı olabilir.

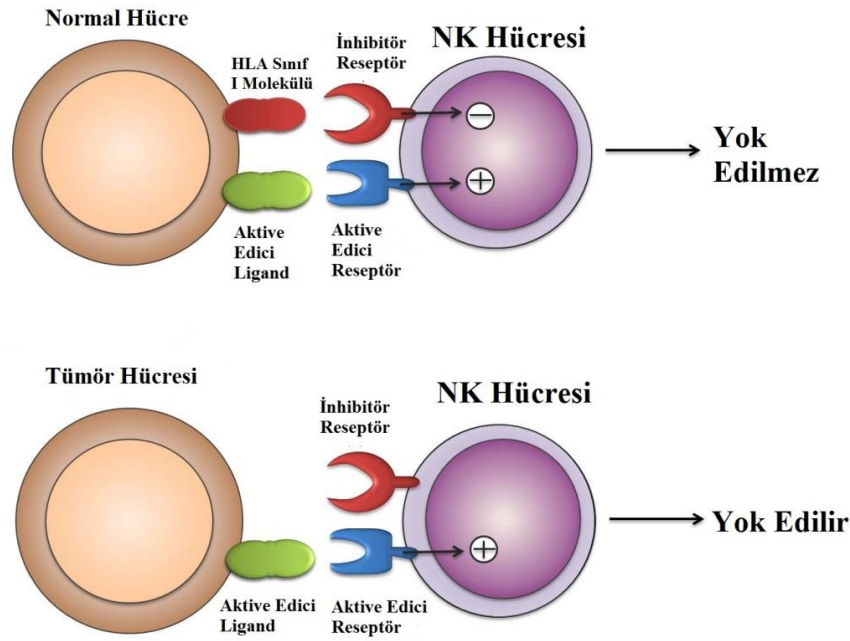
Vücudumuzun bağışıklık sistemi temelde, herhangi bir yabancı antijene karşı ilk savunma mekanizması olarak 'doğal immünite' ve sonrasında daha yavaş olarak devreye giren 'edinsel (adaptif) immünite' mekanizmalarına sahiptir. Normal bir sağlıklı bireyde, vücuda giren herhangi bir patojene veya genetik sapmaya uğramış herhangi bir hücreye karşı öncelikli olarak doğal bağışıklığın elemanları olan nötrofil ve monosit gibi fagositik hücreler, NK'lar, kompleman sistemi, birtakım sitokinler ve bazı plazma proteinleri devreye girmektedir (Şekil 2-4). Daha sonra ise yapıtaşlarını B ve T lenfositlerinin oluşturduğu, diğer bazı immün sistem doku ve organlarının ve onların salgıladığı antikorların da devreye girdiği edinsel immünite devreye girmektedir. Doğal ve edinsel immünite, sağlıklı bir bireyi hücre içi ve dışı çeşitli patojenlere karşı ve hücrenin standart hücre döngüsünden çıkmış ve konağa yabancılaşmış hücrelerine karşı korumada oldukça sağlam bir savunma sistemi oluşturmaktadır (18).



**Şekil 2-4: İmmün sistem ve elemanları şematik gösterimi**

İmmün sistemin bu kuvvetli savunma mekanizmasına rağmen kanserli hücreler bu sistemden kaçabilmek üzere bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir. Hücre yüzeyinde ifade edilen klasik olmayan HLA Sınıf I antijenlerinden HLA-G'nin immüniteden kaçabilmek üzere edinsel bağışıklığın birer faktörü olan NK'lar ve CTL'lerin baskılanmasından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Bu durumu hücre yüzeyindeki KIR baskılayıcı reseptörlere bağlanarak gerçekleştirebilmektedir.

KIR'lar NK hücreleri tarafından ifade edilmektedirler ve HLA-G'ye spesifik bir reseptör sunmaktadırlar. HLA-G antijenleri ise bu reseptörler aracılığıyla endotel hücreler gibi profesyonel antijen sunucu hücreler, T hücreleri ve NK hücreleri ile direkt etkileşime girerek onların baskılanmasını sağlamaktadır (Şekil 2-5) (19). Bu nedenle birçok kanser türünde, kanser hücrelerinin yüzeylerindeki HLA-G ifadesini arttırdığı görülmüştür.



**Şekil 2-5: NK hücrelerinin hücre yüzey reseptörü HLA Sınıf I ifadesine göre baskılanması**

CTL olarak bilinen sitotoksik T lenfositleri ise hücreyel immünitenin ikinci büyük efektör mekanizmasıdır. CTL'ler enfekte hücre ve kanserli hücreler üzerindeki HLA Sınıf I-ilişkili peptidleri tanıyarak bu hücreleri ortadan kaldırmaktadırlar (20). Bu mekanizma karşısında ise kanserli hücrelerin hücre yüzeyinde HLA Sınıf I moleküllerinin ifadesini azalttığı gözlenmiştir.

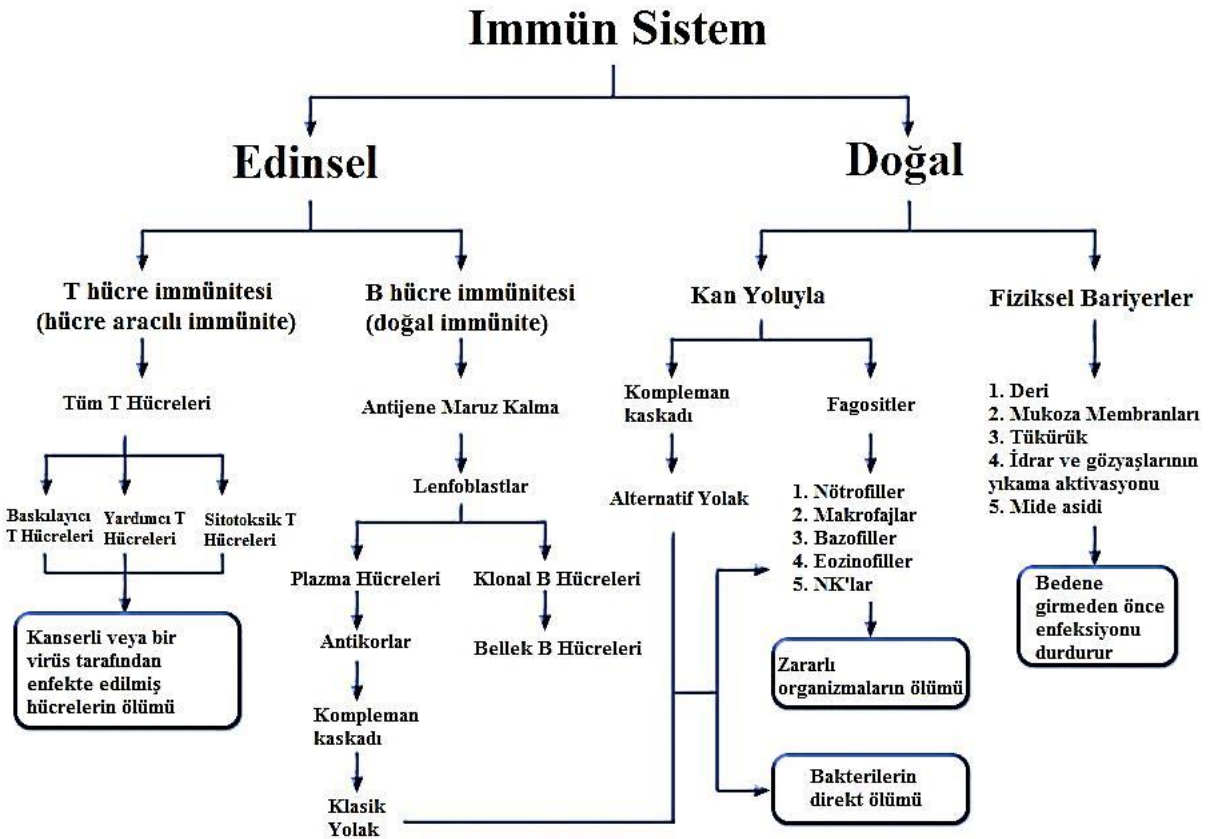
Kanser ve immünite arasında dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta ise kanserin immün sistemi zayıflatabilme yeteneğidir. Kemik iliği enfeksiyona karşı savaşmaya yardımcı olan kan hücreleri üretmektedir. Kanser ise kemik iliğine sıçrayarak immün sistemde görevli bir takım hücrelerin üretimini durdurmakta veya zayıflatmaktadır. İmmün sistemin zayıflaması çoğunlukla lösemi veya lenfoma gibi kanser çeşitlerinde gerçekleşmektedir. Fakat diğer kanser türlerinde de daha nadir de olsa meydana gelebilmektedir. Kemik iliğindeki kanser, kemik iliğinin birçok kan hücresi üretimini durdurmaktadır.

Bununla birlikte, kemoterapi, biyolojik terapiler veya radyoterapi kemik iliğinde üretilen beyaz kan hücrelerinin sayısında düşüşe sebep olarak immüniteyi zayıflatmaktadır. Ayrıca yüksek dozlardaki steroidler de kullanım süresince immün sistemin zayıflamasına sebep olmaktadır.

Görüldüğü üzere kanserli hücreler bazı antijen veya moleküllerin ifadesini azaltıp bazılarını ise artırarak immün sistemin savunma mekanizmalarından kaçabilmektedirler. Bu nedenle, bu alanlarda her geçen gün yeni terapötik tanı ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

### 2.3. İmmün Sistem ve İmmün Yanıt

Vücudu yabancı istilacıların saldırılarına karşı savunmak için birlikte çalışan hücre, doku ve organ ağının tümüne immün sistem ve bunlara karşı verilen cevaba ise immün yanıt denilmektedir (17). İmmün sistemin rolü, hastalıklara ve zarar görmüş vücudun diğer hücrelerine karşı vücudu korumak ve savunmaktır. İmmün sistem tam anlamıyla doğru bir şekilde işlev gösterdiğinde virüs, bakteri ve parazit gibi birçok farklı türdeki tehlikeyi tanımlayabilmektedir (21).



Şekil 2-6: İmmünite ve immün sistem hücreleri



İmmün sistem, kalıtsal (non-spesifik, doğal) immünite ve edinsel (spesifik) immünite olmak üzere temelde iki yapıdan oluşmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi, kompleman ve sitokinlerin içinde bulunduğu antikora dayalı (hümorale) bağışıklık ve NK'lar, makrofajlar ve nötrofillerin içinde bulunduğu hücresele bağışıklık olarak sınıflanabilir (Şekil 2-6). Hücresele bağışıklık cevabı, yutma işlemi olan fagositer hücrelerde hücre içi yaşam gösteren veya fagositer olmayan hücreleri enfekte eden mikroorganizmalara karşı yapılan T hücre aracılıklı bir savunma mekanizmasıdır (22).

### **2.3.1. Doğal (Spesifik-olmayan) İmmünite**

Doğal ya da non-spesifik olarak adlandırılan bağışıklık sisteminin görevi organizmaya ait olmayan hücre veya antijenleri ayırt ve tespit etmektir. Bu sistem vücuda giren ya da alınan her türlü maddeyi öncelikle tanımaya ve kendi hücrelerinden ayırt etmeye çalışmaktadır. Enfeksiyonlara karşı organizmanın savunulmasında ilk adımı doğal bağışıklık sistemi oluşturmakta ve ayrıca enfeksiyonun kontrol edilmesinin ardından ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır (23).

Tüm canlılar bazı ortak patojenlere karşı doğal bağışık savunmaya sahiptir. Vücudun bu patojenlere karşı oluşturduğu birincil savunma mekanizması vücudumuzu saran derimiz ile başlamakta ve bunun yanı sıra solunum, gastrointestinal ve ürogenital sistemin epitel ve mukoz yapıları da diğer bariyer yapıları oluşturmaktadır. Bu bariyerin ikinci bölümünde ise kan ve dokularda yer alan nötrofiller, eozinofiller, makrofajlar, NK'lar, kompleman sistemi, sitokinler ve akut faz proteinleri gibi bir çok farklı savunma hücreleri yer almaktadır (24).

Doğal bağışıklık cevabı ilk birkaç saat içinde gelişmekte ancak uzun süreli bir bağışıklık yanıtı sağlayamamaktadır. Bağışıklık hafızaları olmadığından dolayı aynı patojenle tekrar karşılaştıklarında yine aynı şekilde cevap vermektedirler (25). Örneğin doğal bağışıklık sisteminde bulunan NK'lar kemik iliği kökenli hücrelerdir ve bu hücreler daha önceden tanıyıp duyarlı hale gelmeden de bakteri, mantar, parazit ve tümör hücrelerini ortadan kaldırma özelliğine sahiptirler. Doğal bağışıklık sistemi, edinsel bağışıklık sistemine uyarı ve tanıtım görevinde de bulunmaktadır.

### 2.3.2. Edinsel (Spesifik) İmmünite

Edinsel bağışıklık sistemi, antikorların içinde yer aldığı hümmoral sistem ile, T ve B lenfositlerin bulunduğu hümmresel sistem olarak tanımlanabilir (26). Edinsel bağışıklık, B lenfositlerin ürettiği antikor denilen proteinler tarafından oluşturulan hümmoral bağışıklık ile hümmoral bağışıklığın etkili olamadığı hümmre içi savunmada görev alan ve T lenfosit aracılı hümmresel bağışıklık olarak ele alınabilmektedir. B lenfositler tarafından üretilen antikorlar özellikle hümmre dışı kaynaklı antijenleri tanımak için tasarlanmışken, T lenfositler hümmre içi kaynaklı antijenleri tanımaktadırlar (27).

Edinsel bağışıklık sistemi yaşam boyu gelişimini sürdürmekte, farklı patojenlere ve maddelere özelleşmiş bir şekilde yanıt vermektedir ve ayrıca doğal bağışıklıktan farklı olarak antijene spesifik olmasının yanında hafıza oluşturabilmesi gibi de iki temel özelliğe sahiptir (28). Edinsel bağışıklığın en temel ve önemli iki özelliği budur. Bu sistem bir antijenle karşılaştığında uyarılarak özelleşmiş bir cevap verebilme, daha sonra aynı uyararla tekrar karşılaştığında daha önceki antijeni hafızasına almış olduğundan dolayı onu tanıyarak daha güçlü bir şekilde yanıt verebilme yeteneğine sahiptir.

Edinsel bağışıklık, belirli hastalıkları oluşturabilecek patojenleri hedef alan antikor üretimi ve T hümmreleri üretimi yaparak özel bir bağışık yanıt oluşturmaktadır (29). Bu tür bağışıklığın oluşabilmesi çok uzun bir süre alabileceği için dışarıdan gelecek olan ilk saldırıları önlemede etkili değildir ancak daha sonraki ataklar için çok önemli bir sistemdir (30).

Edinsel bağışıklık aktif veya pasif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Aşı yapılması ve enfeksiyon geçirilmesi aracılığı ile sağlanan bağışıklık yanıtı aktif bir bağışıklık cevabı iken, edinsel olarak bağışıklığı olan bir kişiden alınan serum ya da hümmrelerin, bağışıklığı olmayan bir kişiye hazır halde verilmesi ile sağlanan bağışıklık ise pasif bağışıklık cevabı olarak adlandırılabilir (31).

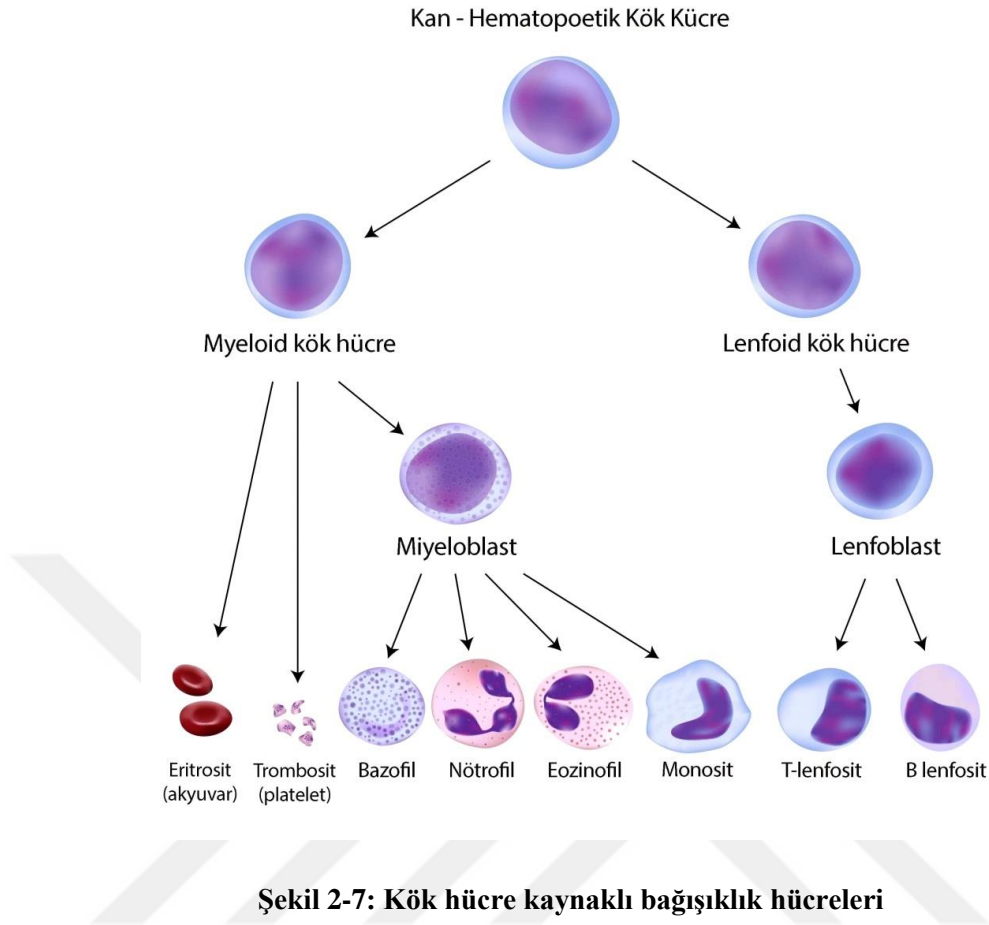
### 2.4. İmmün Yanıtta Rol Oynayan Hümmreler

Bağışıklıkta rol oynayan hümmreler vücudumuzda bulunan çeşitli doku ve organlarda yer almaktadırlar. Bu hümmrelerin tamamının ilk kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliğinde bulunan ana (kök) hümmrelerin farklı yönde gelişmeler göstermesi ile bağışık yanıtı oluşturan hümmreler meydana gelmektedir (32). Kemik iliğinde bulunan ana

hücreler immün cevapta rol almadan önce farklılaşması gerekmektedir. Bu farklılaşma için primer (birincil) lenfoid organlar adını verdiğimiz organlara gitmelidir. Bu organlarda farklılaşması ve gelişmesini tamamlaması gerekmektedir. Daha sonra sekonder (ikincil) lenfoid organlar dediğimiz organlara gelen, artık gelişimini tamamlamış bu hücreler immün cevapta rol oynamaya hazır bulunmaktadır (33).

İmmün sistemi oluşturan hücreler, kemik iliğinde kök (ana) hücre adı verilen ve farklı yönde gelişme gösteren hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 2-7). Bunlar iki grupta toplanabilir :

- Lenfoid Hücreler
  - B ve T Lenfositler
  - NK Hücreleri
- Myeloid Hücreler
  - Monositler
  - Polimorfonükleer Lökositler



### 2.4.1. Lenfoid Hücreler

Lenfositler immün sistem içerisinde yer alan beyaz kan hücrelerinin bir çeşididir. Başlıca iki tür lenfosit vardır; T ve B hücreleri. Bu iki tip lenfosit birincil lenfoid organlarda (timus ve kemik iliği) olgunlaşmaktadırlar. Birincil lenfoid organlarda oluşan bu lenfositler, kan dolaşımı yoluyla ikincil lenf organlarında özel yerlere yerleşmektedirler (34). T hücresi kendi ana hücrelerinden timusta gelişirken, B hücresi ise fetal yaşamda fetal karaciğerde, doğum sonrası ise kemik iliğinde gelişmektedir. Bu lenfoid organlarda T ve B lenfositlerin kendi yüzey antijenleri gelişirken aynı zamanda antijen tanıma kabiliyetlerine de kavuşmaktadırlar (27).

Lenfositlerin antijen reseptörü içermeyen üçüncü grubuna doğal öldürücü hücreler (NK) denilmektedir (15). NK hücreleri kemik iliğinde bulunan lenfoid öncü hücrelerden gelişmektedirler ve işlev olarak T ve B hücrelerinden farklıdırlar. Önceden uyarılmadan bazı tümör hücreleri (taze tümör hücresi değil) üzerinde öldürücü etkiye sahiptirler. NK hücreleri timusta olgunlaşma süreci geçirmemektedir.

### 2.4.1.1. B ve T Lenfositler

Günlük olarak çok sayıda lenfosit merkezi veya birincil lenfoid organlarda farklılaşmaktadırlar. Bir yetişkinde toplam  $10^{12}$  sayıda lenfosit mevcuttur. Yetişkin dolaşımındaki lökositlerin % 20'sini lenfositler oluşturmaktadır (15).

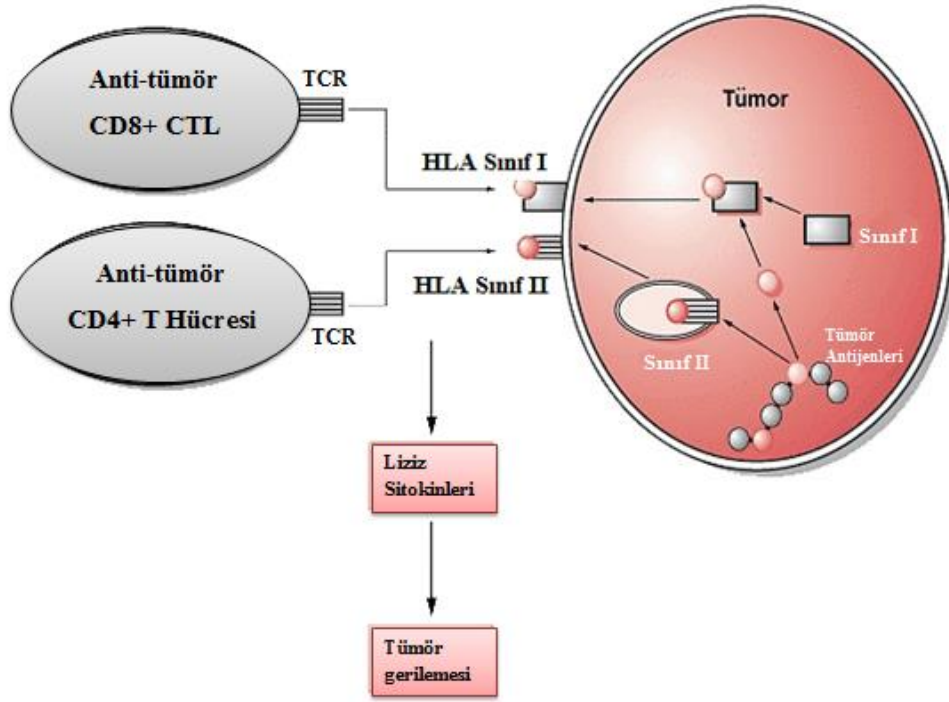
Lenfositler, antijen reseptörleri olan edinsel bağışıklık sisteminin önemli hücreleridirler. Kemik iliğinden köken alan lenfositler timus gibi merkezi lenfoid organlarda olgunlaşmaktadırlar (34). Lenfositlerin farklı yüzey antijenleri, farklı işlevleri ve alt tipleri bulunmaktadır. B lenfositleri savunmanın önemli bir parçası olan antikor üretiminden sorumlu iken, T lenfositleri timus bezinde olgunlaşarak yardımcı T lenfositleri, sitotoksik T lenfositleri ve benzeri yapılara ayrılarak hücrel savunma ve bağışıklıkta rol almaktadırlar (32).

**T Lenfositler:** T hücreleri hücrel immünitinin bir parçasıdır. Bu hücreler, belirli antijenlerle, antijene özgül olarak uyarılmaktadırlar. T lenfositleri yüzeyinde, antijenleri özgül olarak tanıyan T hücre reseptörleri mevcuttur. T hücrelerinin antijen reseptörleri, yalnızca peptid yapılı antijenleri tanımaktadır; bu peptidler major histokompatibilite antijenleri (MHC) adı verilen özel peptid-sunan moleküllere bağlı durumdadırlar. MHC moleküllerine insan lökosit antijenleri (HLA) de denilmektedir. T hücre reseptörleri, yabancı antijeni MHC antijenlerinin bazı komponentleriyle birlikte olduğunda bir kompleks olarak tanımaktadır (18).

T lenfositleri, bir takım patojenler tarafından enfekte hale getirilmiş yani hücre içi mikropları taşıyan hücreleri yok eden  $CD8^+$  sitotoksik (sitolitik) veya baskılayıcı T lenfositleri ve hem doğal hem de edinsel bağışıklık cevabını düzenleyen ve antikor yapımı için B hücrelerine ve yutulmuş mikropların yıkılması için fagositlere yardımcı olan  $CD4^+$  yardımcı T lenfositleri (T helper- $T_H$ ) olmak üzere başlıca iki alt gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 2-8) (15).

T lenfositlerinin alt gruplarından birisi olan  $CD8^+$  sitolitik T lenfositleri yani CTL'ler, özellikle kanserli hücreler üzerinde oldukça fazla öneme sahiptir. CTL'ler hücrel immünitinin ikinci büyük etkili mekanizmasıdır ve enfekte hücrelerin yüzeylerindeki HLA Sınıf I ilişkili peptidleri tanıyarak bu hücreleri ortadan kaldırmakla görevlidirler (35). Bunun sebebi  $CD8^+$  T hücrelerinin yalnızca  $CD8$ 'in bağlanabildiği HLA molekülleri olan HLA sınıf I moleküllerinin gösterdiği peptidlere yanıt

verebilmesidir.  $CD8^+$  T hücrelerinin aktivasyonu HLA Sınıf I-ilişkili peptidlerin tanınması ile uyarılmaktadır (36). Efektör CTL'ler antijeni tanıdıktan sonra aktive olmakta ve böylece granüllerindeki maddeler hedefle temas edilen bölgeye ekzositozla boşaltılmaktadır. Kısaca perforin olarak adlandırılan bu granüller hedef hücre membranında delikler açarak hücrede DNA parçalanmasına ve dolayısıyla da apoptoza neden olmaktadır (37). Bu nedenle enfekte veya kanserli hücreler, bağışık yanıtta kaçabilmek üzere hücre yüzeylerinde HLA Sınıf I ifadesinin seviyesini azaltmakta ve CTL'lerin aktivasyonundan kaçınma yönünde hareket etmektedirler. CTL'lerin aktivasyonundan kaçabilen bu hücreler, dolayısıyla apoptozdan da kaçmış olacaktadırlar.



Şekil 2-8: Tümör hücresi ve T lenfositleri arasındaki etkileşim

**B Lenfositler:** B hücreleri humoral immünitinin bir parçasıdır. Kan dolaşımında bulunan lenfositlerin %5-15'ini oluşturmaktadırlar. B lenfositleri sentezledikleri immünglobulin (Ig) moleküllerini yüzeylerinde taşımaktadırlar. Bu moleküller antijenlere özel olan reseptörlerdir. Antijenik uyarım sonucu B lenfositleri plazma hücrelerine farklılaşmaktadırlar. Bunun sonucunda antijene özgül Ig sentezlemeye

başlarlar (32). Plazma hücrelerine farklılaşmayan bir grup B lenfosit ise özgül antijenik uyarıyı tanıyıp saklayan bellek hücrelerine dönüşmektedirler.

B hücreleri yüzeylerinde antijenleri tanıyan ve hücre aktivasyon işlemlerini başlatan reseptörler olarak görev alan antikolar içermektedirler. Çözünür antijenler ve mikropların veya diğer hücrelerin yüzeylerindeki antijenler B hücre yüzeylerindeki bu antijen bağlayan reseptörlere bağlanarak hümoral immüneyi aktive edebilirler.

Antikolar dolaşıma ve mukoza sıvılarına salınarak kanda ve gastrointestinal, solunum yolları gibi mukozal organların lümenlerinde mevcut olan mikropları ve mikrobik toksinleri etkisiz hale getirmektedirler. Antikoların en önemli özelliklerinden bir tanesi mukozal yüzeydeki ve kandaki mikropların konak hücrelere ve ilgili dokulara erişmesini ve yerleşmesini engellemektir. Bu şekilde, antikolar enfeksiyonları daha yerleşmeden engellemektedirler. Bununla beraber, B lenfositlerinin çoğunda HLA Sınıf II antijenleri mevcuttur ve bu antijenler ise T lenfositleri ile etkileşimde oldukça önem teşkil etmektedirler (15).

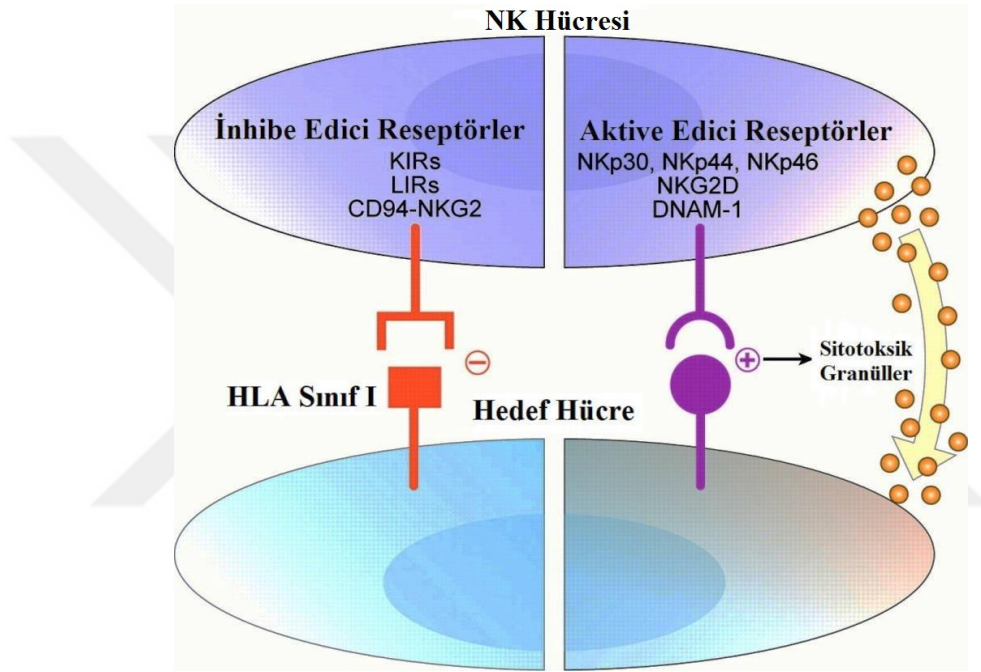
#### **2.4.1.2. Doğal Öldürücü (Natural Killer-NK) Hücreler**

NK'lar hücre içindeki mikroorganizmalara cevap olarak hücrenin ölümüne neden olan ve makrofajların aktive olmasına neden olan IFN- $\gamma$  salgılayan lenfosit hücre sınıfıdır. Kan lenfositlerinin %10'unu oluşturmaktadırlar. NK'lar doğal immüneyin bir parçasıdır ve B ve T lenfositlerinde bulunan antijen reseptörlerine sahip değildirler (27).

Morfolojik olarak büyük granüllü lenfositler olarak tanımlanmaktadır. Tümör hücrelerine ve virüs tarafından enfekte olmuş hücrelere karşı sitotoksik etki göstermektedirler. NK'lara "doğal" öldürücüler denmesinin sebebi, sitotoksik T hücrelerinden farklı olarak antijen üzerinde etki göstermeleri için antijeni daha önceden hatırlamalarının gerekli olmaması ve ilk savunma sistemini oluşturmalarıdır. Sitotoksik T hücreleri gibi potansiyel kimyasallar barındıran granüller içermektedirler (34). Özellikle hematopoetik tümör hücrelerine karşı litik etki göstermektedirler.

NK hücrelerinin yüzeylerinde konak hücre yüzeyindeki moleküllere karşı bazı reseptörler mevcuttur. Hücrenin yüzeyinde bulunan bu reseptörlerden bazıları NK hücrelerini aktive ederken bazıları ise baskılayıcı işlev göstermektedirler (Şekil 2-9). Aktivasyon reseptörleri arasında virüs ile enfekte olmuş hücre yüzeyinde ya da hücre içi

bakteri ya da virüsleri fagosite etmiş hücrelerin yüzeyinde yer alan molekülleri tanıyan reseptörler; ayrıca normal hücrelerin yıkımına yol açan, enfekte olmamış konak hücre yüzey moleküllerini tanıyan reseptörler yer almaktadır. Ancak bu durumu engelleyip, NK'ların aktivasyonunu durduracak olan, normal hücre moleküllerini tanıyan NK'ların baskılayıcı reseptörleridir. Bu inhibitör reseptörler, her bireyin çekirdekli hücrelerinin taşıdığı HLA Sınıf I moleküllerinin çeşitli allelleri için özgüllük göstermektedirler (18). NK yüzeyindeki baskılayıcı reseptörlerin başlıcaları; KIR, CD94 proteini ve NKG2 reseptörleridir (19).



**Şekil 2-9: NK Hücre İnhibitör ve Aktivatör Reseptörleri**

Birçok virüs, enfekte ettikleri hücrelerin yüzeylerindeki HLA Sınıf I ifadesini bloke etmektedir. Aynı durum kanserli hücrelerin yüzeylerindeki HLA Sınıf I ifadesi için de geçerlidir (38). Bu durum, enfekte veya kanserli hücrenin HLA Sınıf I ifadesi varlığında aktive olan CTL saldırısından kurtulmasına neden olmaktadır. NK'ların immün sistemde ve kanser immünitesinde bu derecede önemli olmasındaki en büyük sebep, HLA Sınıf I eksikliğinde NK'ların inhibitör reseptörlerinin etkili olmaması ve bu enfekte veya kanserli hücrelerin tanınarak yıkıma uğratılmasıdır (39). Böylece yukarıda bahsedildiği üzere Sınıf I ifadesi seviyesini azaltarak CTL'lerden kaçabilen enfekte veya kanserli hücreler NK'lara yakalanarak yıkıma uğramaktadırlar.



NK hücrelerinin enfeksiyonlara karşı etkinlik gösterebilmesi için, makrofajlar tarafından salgılanan bir sitokin olan interlökin-12 (IL-12)'ye ihtiyacı vardır. IL-12, NK uyarıcı bir özelliğe sahiptir ve makrofajlar fagosite ettikleri mikroorganizmaları parçalarken IL-12 sentezi yapmaktadırlar (40). IL-12, NK'ları aktive ederek interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) üretmelerini tetiklerken; sentezlenen IFN- $\gamma$  bir geribildirim ile makrofajlara etki ederek, içlerine aldıkları mikroorganizmayı daha etkili biçimde yıkıma uğratmalarına katkıda bulunmaktadır. Sonuç olarak, NK'ların IFN- $\gamma$  gibi önemli bir sitokinin sentezini gerçekleştirerek, makrofajlarca fagosite edilen mikroorganizmaların daha güçlü biçimde yok edilmelerini sağlayan bir görevi vardır (41).

NK hücrelerinin bir diğer görevi ise enfekte hücrelerin yüzeylerinde deliklerin oluşmasına yol açarak enfekte hücreleri CTL'lerin etki mekanizmalarına benzer bir yöntem ile yok etmektir (42). Bunu iki şekilde gerçekleştirebilmektedir; birinci grup, enfekte veya yabancı hücreyi tanıyan NK'lar aktive olduktan sonra, içerdikleri proteinler ve sitoplazmik granüller ile enfekte hücrelere doğru yönelerek bu hücrelerin yüzeyinde delikler oluştururken ikinci grup ise, hücre içerisine girerek apoptotik ölüme neden olacak enzim sistemlerini uyarmaktadır (18).

#### 2.4.2. Myeloid Hücreler

Kan hücreleri geliştikçe, farklı "aileler" de kök hücrelerinden gelişerek kollara ayrılmaktadırlar. Myeloid hücre serisi böyle bir aileyi temsil etmektedir. Myeloid hücre serisindeki hücreler, myeloid öncül hücrelerden gelişen serilerdir ve en sonunda spesifik olgun kan hücrelerine dönüşeceklerdir. Bu hücrelere genel olarak fagositler adı verilmektedir ve iki alt başlık altında toplanabilmektedirler;

- Monositler,
- Polimorfnükleer Lökositler
  - Nötrofiller,
  - Eozinofiller,
  - Bazofiller ve Mast Hücreleri,
  - Trombositler,

olarak alt gruplara ayrılmaktadırlar (43).

## 2.5. İmmün Yanıtta Rol Oynayan Hücrelerin Kansere Olan İlişkisi

Tümörlere karşı verilen immün cevap oldukça karmaşıktır. İmmün sistem hücreleri, immün düzenleme olarak adlandırılan bir süreç ile malign hücrelerin tanımlanması ve reddedilmesi aracılığıyla tümör büyümesini ve gelişimini baskılayabilmektedir. Bununla beraber, yine de immün cevap onkojenik inflamasyon başlangıcı aracılığıyla tümör hücre büyümesine, kaçışına ve anjiyogenezine katkıda bulunabilmektedir (44).

İmmün sistem hücrelerinin fizyolojik işlevinin, değişime uğramış hücrelerin büyümesini engellemek veya bu hücreleri zararlı tümörlere dönüşmeden önce yok etmek olduğu düşünülmektedir. Bu durum 'immün gözetim' olarak adlandırılmaktadır. Birçok klinik deney, immün yetersizliği olan bireylerde bazı tip tümörlere daha sık rastlandığını ve çeşitli tümör tiplerinin etrafındaki lenfositik infiltrasyonun daha iyi prognoz ile korelasyon gösterdiğini ispatlamıştır. Bu durum, tümörlere karşı immün gözetimin, tümörlerin büyümesini engellemekte önemli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, tümörlerin diğer açılardan sağlıklı bireylerde geliştiği gerçeği, tümöre karşı bağışıklığın çoğunlukla zayıf kaldığını ve hızlı büyüyen tümörlerce kolaylıkla alt edilebildiğini göstermektedir (44).

Basit bir hücrenin kanser hücresine dönüşümü çok basamaklı bir durumdur. Bu durum, yıllar içerisinde değişen hücrede meydana gelen genetik değişiklikleri içermektedir ve kontrolsüz çoğalma ve birikim sonucunda da tümör meydana gelmektedir (45). Bağışıklık sistemi tarafından tanınan tümör hücreleri büyük olasılıkla yok edilirken; bağışıklık sisteminden gizlenmeyi başarabilen hücreler kaçarak yaşamına devam etmektedirler. Bağışıklık sisteminden kaçmayı ve mikroçevreye uyum sağlamayı başaran tümör hücreleri, bağışıklık sistemi hücrelerine karşı dirençli hale gelmektedirler.

Tümör gelişimi esnasında, bağışıklık sisteminin değişimlerine dair gözlemler mevcuttur. Kansere öncüsü odaklar gibi erken lezyonlar, genellikle bağışıklık sistemimizin etkili hücreleri olan lenfosit, makrofaj, granülosit gibi hücreler tarafından kuşatmaya alınmaktadır (46, 47). Kolon, meme, ağız içi kanserleri gibi tümörlerin ileri evrelerinde tümörü kuşatan (infiltrate eden) lenfositler (TİL)'in tümör bölgesindeki varlığının hastanın yaşam süresini uzattığı gösterilmiştir (48).



şekillendirebilmektedirler (52). Ayrıca, B hücreleri antijenleri tanıma, antijen işlenişini ve sunumunu düzenleme ve T-hücre ve doğal immün cevabı başlatma ve düzenleme kapasitesine sahiptir. Bu sayede imkan dahilinde granüositler, dendritik hücreler, NK'lar ve myeloid-türevli baskılayıcı hücreler gibi tüm immün hücre tiplerini etkileyebilmektedirler (53). Antikor-aracılı B hücre eksikliğinin anormal T hücre cevabını engellemede etkili bir terapötik strateji olduğu düşünülmektedir. İnsanlardaki solid tümörler sıklıkla tümör mikroçevresini etkilemek için diğer yerleşik hücrelerle işbirliği içerisinde olduğu öne sürülen B hücre popülasyonu içermektedir (54). Bunların dışında, B hücreleri inflamatuvar hücrelerin güçlendirilmesi ve pro-anjiyogenik genlerin ve pro-metastatik kollojenazların artırılması aracılığı ile tümörogeneze direkt olarak katkıda bulunabilir.

NK hücreleri, son yıllarda immün sistemdeki rollerinin yanı sıra kanserle mücadelede oynadıkları rol ile de büyük dikkat çekmişlerdir. Bağışıklık sisteminin doğal öldürücü hücreleri, dolaşımda %8-10 arasında saptanmakta ve vücuttaki tümör hücreleri ile virüs tarafından enfekte edilmiş olan hücrelerin parçalanmasında görev almaktadırlar (55). Buna rağmen pek çok tümör, NK'ların bu parçalama işlevlerine karşı dirençlidir. Normalde dolaşımda ve dokularda lenfositlerin çok küçük bir alt grubunu oluştururlar; ama, tümörlü hastalarda sayıca arttıkları bildirilmiştir (56). NK hücrelerinin, sitokin salgılanması ve çeşitli reseptör-ligand etkileşimleri aracılığıyla, monositik hücreler, dendritik hücreler ve T hücreleri gibi diğer lökositlerin aktivitelerini de düzenledikleri bilinmektedir (57, 58). B ve T lenfosit aktivasyonu hallerinde NK hücreleri azalmaktadır. NK hücrelerinin fazla bulunması metastazlara karşı da direnci arttırmaktadır. NK hücreleri aracılığıyla, *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterildiği üzere, direkt tümör hücre lizisinin esas olarak perforin tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir (59, 60). Perforin gibi bazı enzimlerle tümör hücrelerini parçalamanın yanı sıra NK hücreleri, tümör hücrelerine bir takım reseptörler ile temasta bulunarak tümör hücrelerini ölüme sürüklemektedirler (61). Son zamanlarda yapılmış olan iki foton mikroskopi çalışması, NK hücrelerini infiltre eden tümörlerin hedef hücrelerle kısa sitotoksik etkileşimler oluşturarak NK hücrelerinin çok sayıda kanser hücrelerini hızlı bir şekilde yok etmesine izin verdiğini göstermiştir (62). Ayrıca, NK hücreleri tümörden korunmada ve metastaz yayılımını kontrol etmede potansiyel role sahiptir; ama, bir kez tümör oluşumu, NK hücrelerin anti-tümör fonksiyonları tersine dönebilmektedir. Kısaca NK'lar canlı vücudu içerisinde bulunan enfekte veya tümörojen hücreleri

öldürerek ve makrofajları aktive eden sitokin IFN- $\gamma$ 'yı salgılayarak mücadele veren özel bir lenfosit serisi hücreleri olması bakımından oldukça önemli bir hücre grubudur. Burada en önemli olan mekanizma NK'ların IFN- $\gamma$  sentezleyerek makrofajları uyarmalarıdır.

Makrofajlar, tümöre karşı bağışıklıkta rolü olan hücrelerdendir. İnsan makrofajları hem spesifik olmayan savunmada (doğal immünite) hem de spesifik savunma mekanizmasında (edinsel immünite) işlev göstermektedir. Makrofajlar etkilerini yalnızca fagositoz yoluyla değil aynı zamanda sitokin ve kemokin gibi çeşitli çözülebilir faktörler aracılığıyla da gösteren heterojen bir takım hücreler karışımıdır. Tümör-ilişkili makrofajlar (TAM) gibi tümör-infiltrate edici myeloid hücreler kendi fonksiyonel bölgelerine bağlı olarak kanser hücrelerinin ilerleyişini ve yayılımını düzenlemektedirler. Bununla birlikte, klinik çalışmalar da TAM miktarı ile göğüs, prostat, yumurtalık, rahim, özofegal ve mesane kanserlerinin zayıf prognozu arasında bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir (63). Tümör ilişkili makrofajlar aynı zamanda transformasyon, tümör hücre çoğalması, anjiyogenez, invazyon ve metastaz gibi birçok tümöröenez basamağına da etkiye bulunmaktadırlar. Bunun yanı sıra, TAM'lar kanser ilerleyişinde büyük rollere sahip olan çok çeşitli sitokin, büyüme faktörü, inflamatuvar bileşenler ve proteolitik enzimleri salgılamaktadırlar. Klinikopatolojik çalışmalar akciğer, karaciğer, renal hücre karsinoması (59) ve göğüs kanseri (64, 65) zayıf prognozu ve artan makrofaj yoğunluğu arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. TAM'lar hem T hücreleriyle direkt hücre-hücre etkileşimi aracılığıyla CD8+ T hücre cevabını baskılama yoluyla, hem de IL-10, TGF- $\beta$  ve T hücre aktivasyonunu ve çoğalmasını baskılayan prostaglandinler gibi immünbaskılayıcı proteaz ve sitokinleri salgılama yoluyla immünbaskılamada görev almaktadırlar.

Makrofajlar, olgunlaşmamış monositler olarak kemik iliğinden salınmaktadırlar. Kanda dolaştıktan sonra kemokinler tarafından dokulara alınıp makrofajlara farklılaştırılmakta (66) ve buldukları dokunun fizyolojik ve patolojik durumuna bağlı olarak belirli bir fenotip ve fonksiyon çeşitliliği sergilemektedirler. Hem makrofaj tipleri hem de onların monosit öncülleri tümörlere çevre dokulardan geçebiliyor olsalar bile, yine de tümörlere çoğunlukla kan dolaşımından geçmektedirler (67). Ayrıca aktivasyonlarına bağlı olarak, makrofajlar büyüme faktörü, sitokinler, proteazlar veya kompleman bileşenleri salgılayabilmektedirler. Bunlara ek olarak, bu hücrelerin

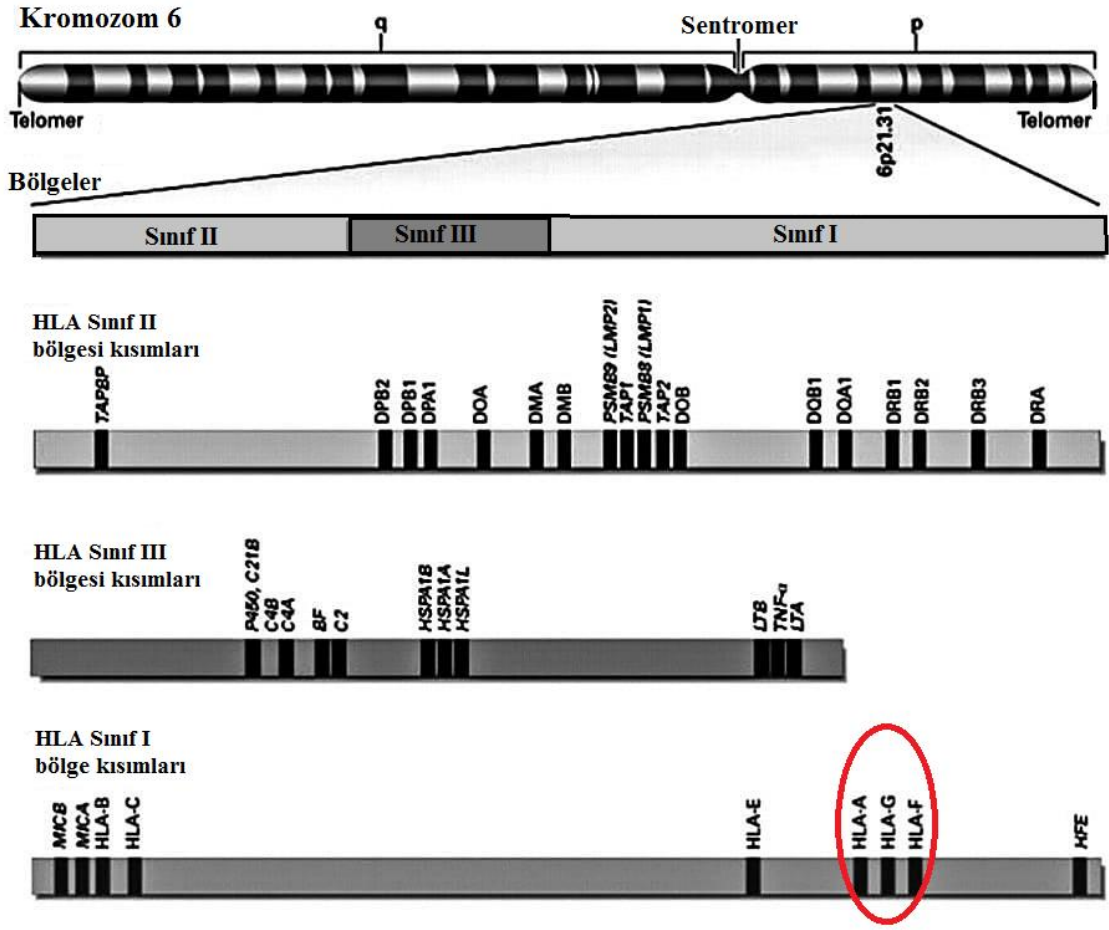
özelleşmesi ve aktivasyonu büyük oranda bölgesel uyarım tarafından etkilenmektedir. Bu uyarımlar sitokinler, adhezyon molekülleri ile etkileşimler veya makrofajların patojenlerle etkileşimi olabilmektedir (62). Bunun yanı sıra, aktive makrofajların özellikle hızlı çoğalan hücreye etkisinin fazla olduğu bilinmektedir. Aktive makrofajın nonspesifik tümör hücrelerini öldürmesinde, fagositoz etkili bir mekanizma değildir. Daha ziyade aktive makrofajın hedef hücreye sitolitik lizozomal enzim naklederek öldürdüğü sanılmaktadır. Makrofajlar tümörlerde de bulunmakta ve burada tümör ile ilişkili makrofaj (TAM) olarak adlandırılmaktadır (62). Normalde makrofajlar antijeni T lenfositlere sunan hücreler olarak enfeksiyon kontrolünde önemli rol oynamaktadırlar. TAM'lar ise maalesef lenfosit fonksiyonlarını baskılamak üzere programlanmışlardır. Yapılan çalışmalarda; tümörün saldırganlığında, TAM sayısının etkili olduğu gösterilmiştir. Saldırgan (invaziv) meme kanserli hastalarda TAM sayısı artışının, yaşam süresinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (68).

## **2.6. HLA ve Kanser**

### **2.6.1. İnsan Lökosit Antijenleri (HLA) ve Kanser Üzerindeki Rolü**

HLA kompleksi, insanlarda majör doku uyumu (histocompatibility) kompleksini (MHC) kodlayan bir gen grubudur ve bağışıklık sisteminin, vücudun kendi proteinlerini virüsler ve bakteriler gibi yabancı istilacılar tarafından üretilen proteinlerden ayırmasına yardımcı olmaktadır (69).

HLA, birçok türde ortaya çıkan bir gen ailesi olan MHC'nin insan versiyonudur. İnsanlarda HLA kompleksi, 6. kromozom üzerinde birbirine yakın bulunan 200'den fazla gen içermektedir. Bu kompleks içerisindeki genler, HLA Sınıf I ve Sınıf II antijenleri olarak kategorize edilmektedir (Şekil 2-11).



Şekil 2-11: HLA gruplarının 6. kromozom üzerinde konumlandığı bölgeler

İnsanlar HLA-A, -B ve -C olarak bilinen üç ana HLA Sınıf I genlerine sahiptir. Bu genlerde üretilen proteinler, neredeyse tüm hücrelerin yüzeyinde sunulmaktadır. Hücre yüzeyinde, bu proteinler, hücre içerisinden hücre dışına aktarılan protein parçacıklarına (peptitler) bağlanmaktadır. HLA Sınıf I proteinleri bu peptitleri bağışıklık sistemine sunmaktadır. Eğer immün sistem, peptitleri yabancı (örneğin viral veya bakteriyel peptitler gibi) olarak tanımlarsa, enfekte olmuş hücreyi kendi kendini imha etmek üzere tetiklemektedir (70).

İnsanlarda altı ana HLA Sınıf II geni mevcuttur: HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA ve HLA-DRB1. HLA sınıf II genleri, yalnızca belirli bağışıklık sistemi hücrelerinin yüzeyinde bulunan proteinleri yapmak için talimatlar vermektedirler. HLA sınıf I proteinleri gibi, bu proteinler de peptitleri bağışıklık sistemi hücrelerine göstermektedir.

Kanser hücrelerini yok etmede önemli bir işlev gösteren bağışıklık sistemi, immün-gözetim yoluyla kansere karşı koruma sağlamasına rağmen, aynı zamanda, tümör immünojenitesinin değiştirilmesi ile, kansere bağışıklık kazandırmaya da yol açabilmektedir. Kanser hücreleri, tümör tanınması ve reddi ile bağlantılı immün sistemin hücresel bileşenlerini devre dışı bırakarak, immün aracılı ölümleri önlemek için çeşitli moleküler mekanizmalardan yararlanmaktadır. HLA molekülleri ve tümör antijenleri, T-hücre reseptörleri tarafından tanınmak üzere HLA ifadesi azaltılmış bir şekilde sunulmak zorunda olduğundan, immün tanıma ve daha sonra da neoplastik hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından yok edilmesi için zorunludur. Düşük HLA Sınıf I ifadesi sitotoksik immün mekanizmaların aktivasyonunu engellerken, düşüğe uğramış HLA Sınıf II ifadesi ise, antijen sunan hücrelerin antijen-sunma yeteneğini etkilemektedir.

Tümör immünologları, tümör hücrelerinin immün tanıma ve yıkımından kaçındığı mekanizmaların tanımlanması ve moleküler karakterizasyonu üzerindeki araştırmalarına odaklanmışlardır (71, 72). Tanımlanan birçok kaçış mekanizması arasında, tümör hücreleri tarafından ifade edilen klasik ve klasik olmayan HLA Sınıf I ve Sınıf II moleküllerindeki değişiklikler, tümör antijeni (TA)-özel bağışıklık yanıtlarının oluşumunda oynadıkları kritik rolden ve NK hücrelerin etkileşimlerini modüle etme yeteneklerinden ötürü, tümör immünologları ve klinik onkologlar için özellikle önem arz eden konulardandır (73). Bu kaçış mekanizmalarının potansiyel klinik önemi, klasik olmayan HLA Sınıf I indüksiyonunun (74) veya bazı malignitelerde hastalığın klinik seyri ile HLA Sınıf II (75) ifadesinin yanı sıra, klasik HLA Sınıf I ifadesindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ilişkilendirildiği şeklinde belirtilmektedir (76). HLA Sınıf I'deki ifade azalışı tümör hücreleri tarafından ifade edilen tümör ilişkili antijen (TAA) seviyesini minimuma indirmektedir ve dolayısıyla onların tanınmalarına ve daha sonra ise CTL tarafından yok edilmelerine neden olmaktadır. Diğer bir mekanizma ise, tümör hücrelerinin hücre yüzeyindeki klasik olmayan HLA sınıf I moleküllerinin (HLA-E ve HLA-G) ifadesini düzenleyebilme yeteneğidir. Bu belirteçlerin ifadesinin kan dolaşımındaki NK hücre tanınmasını baskıladığı bulunmuştur ve bu nedenle de immün takipten tümör hücrelerinin kaçışına neden olmaktadır (20).

Geçmişten bu yana, yüksek sayıda malign lezyon, HLA Sınıf I ve HLA Sınıf II antijene özgü monoklonal antikörlerle (mAb) test edilmiştir (77). Son birkaç yılda



birikmiş kanıtlar, bu moleküllerin, kaçış mekanizmalarına sahip tümör hücreleri sağlayabileceklerini ikna edici bir şekilde gösterdiğinden dolayı, bu çalışmalar HLA-G gibi klasik olmayan HLA Sınıf I antijenlerinin ifadelerinin analizi çalışılmak üzere araştırmacılar tarafından genişletilmiştir (78).

Diğer araştırmalarda da incelendiği gibi (75), karaciğer karsinoması, lösemi ve lenfoma haricinde, klasik HLA Sınıf I ifadesindeki anormallikler, analiz edilen tüm tümör çeşitlerinde tanımlanmıştır. HLA Sınıf I eksikliği ve/veya ifadesinin azalışı, 100'den fazla lezyonun analiz edildiği tümörlerde, test edilen lezyonların %16 ila %80'i arasında bulunmuştur. En yüksek sıklık idrar kesesi, göğüs ve prostat karsinomunda ve en düşük sıklık (frekans) ise renal hücre karsinomu (RHK) ve melanomada bulunmuştur.

Klasik olmayan HLA Sınıf I antijenleri arasında HLA-G ifadesi, HLA-G'ye özgü antikorlar ile bağlanma deneyleri, immünokimyasal deneyler, RT-PCR ve IHK deneyleri ile cerrahi olarak çıkarılmış 150 lezyondan daha fazlası üzerinde en kapsamlı olacak şekilde analiz edilmiştir (20). Hücrelerin kötücül dönüşümlerinin HLA-G varlığı ile alakalı olabileceği konusunda genel bir düşünce mevcuttur. Bu bağlamda, HLA-G ifadesi, B hücre kronik lenfositik lenfoma (KLL) ve non-Hodgkin B ve T hücre lenfomasında olduğu gibi gliyoma (beyin uru), retinoblastoma, göğüs karsinomları, kolon, böbrek, endometrium, yumurtalık ve rahim boynu kanserlerinde de gösterilmiştir.

HLA-G'nin aksine, kötücül hücrelerdeki HLA-E ve HLA-F ifadesine ilişkin daha az bilgi bulunmaktadır (77). HLA-E düzenli olarak çeşitli sağlıklı dokularda ifade edilmektedir ve HLA sınıf I ifadesi ile orantılıdır. Bunun aksine, HLA-G çok nadir olarak sağlıklı dokularda bulunmaktadır fakat buna rağmen tümörlerde sıklıkla gözlenmektedir. HLA-F'in ise EBV-dönüştürülmüş (Epstein-Barr virus-transformed) lenfoblastoid, glioblastoma, karaciğer karsinomu ve transizyonel hücreli mesane hücrelerinden elde edilen hücre hatlarının hücre yüzeylerinde ifade edildiği bulunmuştur (78).

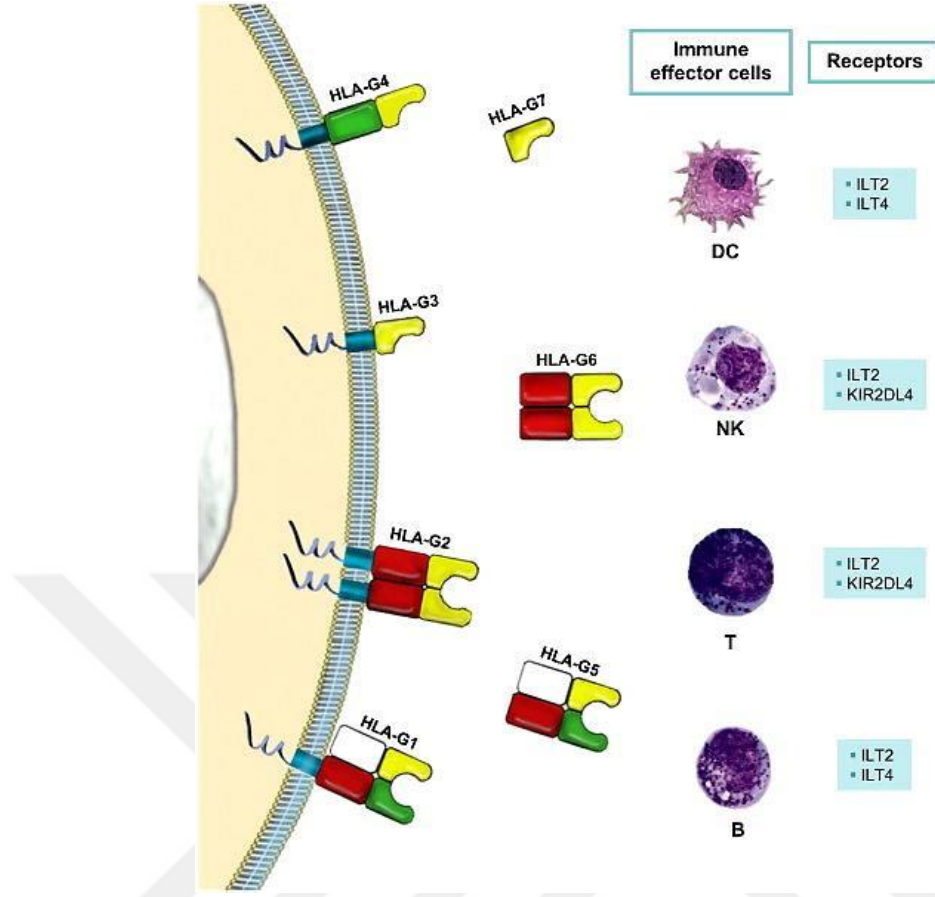
Antijen sunucu hücreler, B lenfositleri ve aktive T lenfositlerinin yüzeyinde ifade edilmesinin yanında, HLA sınıf II antijenleri farklı embriyolojik kökenli malign tümörlerin bir çoğunda da ifade edilmektedirler. İfade sıklığı medullar göğüs karsinomasında %74,5'e, duktal göğüs karsinomasında %17,7'ye (79), renal hücre karsinomasında %100'e (80) ve primer melanomalarda %60'a (81) ulaşmıştır. Çok

sayıda kötücül lezyon, IHK reaksiyonlarında HLA Sınıf II antijen spesifik antikorlarla test edilmiştir (20). Bu çalışmalar, HLA Sınıf II antijenlerinin kötücül hücrelerde sıklıkla ifade edildiğini göstermiştir. HLA sınıf II antijenleri patojenlere ve tümör antijenlerine karşı inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde oldukça önemli bir role sahiptirler. Normal kolonik epitelde ifade edilmemektedirler ancak kolorektal kanser (KRK) hücrelerinde saptanabilmektedirler.

### **2.6.2. HLA-G'nin Kanser Türlerine Göre Dokular Üzerindeki Dağılımı**

Kanser gelişim sürecinde, bazıları tümör gelişimi için elverişli olan ve immün mekanizmadan kaçışta yardımcı olabilen çeşitli değişiklikler yer almaktadır. Bunlar fenotipik değişimlere cevap olarak üretilebilen veya tümör gelişiminin belirli bir takım belirteçlerinin ifadesini ayarlayabilen tümör mikroçevresindeki değişiklikleri içermektedir. Bu hususta keşfedilen en yeni molekül olan HLA-G'nin kanser gelişiminde immün baskılayıcı ve immün düzenleyici role sahip olduğu anlaşılmıştır (82).

Tümör gelişimi hızı, kanser hücreleri ve konakçı bağışıklık sistemi arasındaki sürekli etkileşim tarafından belirlenmektedir. Bağışıklık sistemi tarafından uygulanan seçim baskısı ile, farklı immün efektörler tarafından tanıma ve yıkımı önlemek için tümör hücreleri tarafından çeşitli stratejiler geliştirilmiş ve uygulanmıştır (83, 84). Tümör hücreleri tarafından doğal ve edinsel immün yanıtı kaçmak için kullanılan yaygın stratejilerden biri, klasik olmayan sınıf I molekülü HLA-G'nin indüklenmiş anormal bir ifadesi ile ilişkili bulunmuştur (Şekil 2-12) (85).



Şekil 2-12: HLA-G'nin bağlantı kurduğu immün efektör hücreler ve reseptörler

HLA-G ifadesinin aşırı artışı, çeşitli malignitelerde gözlenmiştir ve tümör hücrelerinin immün efektörlerden kaçışının, metastaz ve kötü prognoz ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu belirtilmiştir. HLA-G, immün hücre sitolizinin, farklılaşmanın, hücre çoğalmasının ve sitokin üretimi baskılanmasının, immün hücre apoptozu indüklenişinin, düzenleyici hücrelerin oluşturulmasının ve myeloid türevli baskılayıcı hücrelerin genişlemesinin ve kemotaksisin bozulmasının engellenmesiyle tümörün kaçırılmasına yol açabilmektedir.

HLA-G ifadesi ilk olarak sitotrofoblastlarda gözlenmiştir (86). Fizyolojik koşullarda, HLA-G ifadesi eritroid öncüllerinde, korneada, timik medullada ve pankreatik adacıklarda da bulunmuştur (87). Kanserde HLA-G ifadesi ise ilk kez melanom bağlamında gösterilmiştir (88). O zamandan beri, hem katı hem de hematolojik maligniteler de dahil olmak üzere otuz tipteki tümör arasında 2000'den fazla malign örnekte HLA-G ifadesi incelenmiştir (89, 90). Bu çalışmalar arasında, sağlıklı dokuda eksikliği bulunan HLA-G ifadesi yüksek sıklıkta bulunmuş olup, çeşitli

kanser tiplerinde çeşitli vücut sıvılarında artmış sHLA-G seviyeleri tespit edilmiştir. HLA-G ifadesinin, daha ileri hastalık evresi, tümör metastazı ve/veya tümörlü hastalarda daha kötü prognoz gibi klinik parametreler ile korele olduğu belirlenmiştir; böylece HLA-G ifadesinin ileri klinik evre ve hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur ve bu nedenle HLA-G ifadesi göğüs kanseri (91), kolorektal kanser (92), rahim ağzı kanseri (93), endometrial karsinom (94), mide kanseri (95), glioblastoma (96), hepatosellüler karsinom (97), akciğer kanseri (98), yumurtalık kanseri (99), pankreas kanseri (100), tiroid kanseri (101) gibi birçok katı malignite için olumsuz bir prognostik faktör olabileceği de öne sürülmüştür.

HLA-G gen ifadesinin düzenlenmesi, çeşitli tümör tipleri arasında farklılık gösterebilmekte ve tümörlerin mikro-ortamının yanı sıra hücrelerin malign transformasyonunun altında yatan patogeneze de etkilenebilmektedir.

Yie ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada HLA-G protein ifadesinin, mide karsinomlarının primer yerleşiminin %71'inde görüldüğünü ancak normal mide dokularında görülmediğini saptamıştır. Tümörlerde HLA-G ifadesinin, tümörün yeri, histolojik derecesi, invazyon derinliği, lenf nodu metastazı, hastalığın klinik evreleri ve konak immün yanıtı ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu göstermişlerdir. HLA-G pozitif tümörleri olan hastaların, HLA-G negatif tümörleri olan hastalardan anlamlı olarak daha kısa bir sağkalım süresine sahip olduklarını belirtmişlerdir (102).

Benzer bir şekilde, Ye ve arkadaşları, HLA-G proteininin kolorektal kanser örneklerinin % 65'inde ifade olduğunu göstermişlerdir. Bununla beraber, kolorektal kanser de dahil olmak üzere, epitelyal tümörler üzerinde yapılan diğer çalışmalarda, immünohistokimya ile belirlenen HLA-G protein ifadesinin kolorektal kanserlerin %54'ünde, yumurtalık kanserlerinin %50-61'inde (103), invaziv duktal meme kanserlerinin %25'inde (104), böbrek hücre kanserlerinin % 61'inde (105), endometriyal adenokarsinomun % 55'inde (106) ve çeşitli gastrointestinal kanserlerin %52-79'unda (107) görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada, I.evre hastaların % 43'ünde ve II. – IV. evre hastaların ise % 70-71'inde HLA-G pozitif boyanma olduğundan dolayı HLA-G ifadesi ile kolorektal kanserin çeşitli evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür (108). Çalışmadaki sonuçlar, diğer raporlanan verilerle tutarlı bulunmaktadır ve HLA-G ifadesinin malign transformasyon için oldukça spesifik bir belirteç olduğu fikrini güçlü bir şekilde desteklemektedir (109).

Lin ve arkadaşları, özefagus skuamöz hücreli karsinom (ESCC) içeren örneklerin %90,9'unda HLA-G proteininin ifade edildiğini ve bunların % 76,4'ünün orta veya güçlü HLA-G ifadesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu sonucun, aynı anti-HLA-G monoklonal antikor kullanılarak kolorektal kanser (genel pozitif oran %65, %50 orta veya güçlü HLA-G ifadesi) üzerine yapılan bir çalışmada bulunandan çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçların diğer bildirilen verilerle tutarlı olduğu görülmüş (110) ve böylece HLA-G ifadesinin malign transformasyon için oldukça spesifik bir belirteç olduğu fikrinin güçlü bir şekilde desteklendiği saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, ESCC'lerin % 90,9'u primer tümör içinde HLA-G ifadesi göstermiş ve vakaların çoğunda, HLA-G'nin membranla ilişkili veya membranöz ve sitoplazmik bir modeli olduğu bulunmuştur. Bu bulgunun, HLA-G'nin ESCC'li hastalarda antikor bazlı bir tedavi için potansiyel bir hedef olabileceğine işaret ettiği belirtilmiştir (111).

He ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışma ile neoplazm lezyonlarının yaklaşık %66'sında pozitif HLA-G ifadesi olduğu tespit edilmiştir. Pozitif HLA-G ifadesi olan hastaların negatif HLA-G ifadesine sahip olanlardan daha düşük bir sağkalım oranına sahip olduğu görülmüş ve bunun yanında, plazmadaki sHLA-G düzeylerinin, meme kanseri hastalarında, sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu da belirtmişlerdir (112).

Akut Lenfositik Lösemi (ALL) hastaları üzerinde yapılan birtakım çalışmalarda, kemoterapiden önce ve sonra membrandaki HLA-G ifadesi seviyesi araştırılmış ve ALL hastalarında terapiden sonraya oranla terapiden önce çok yüksek miktarda HLA-G ifadesi miktarının saptandığı gözlemlenmiştir ancak bu sayının terapiden sonra azaldığı ortaya konulmuştur. Ayrıca yine cerrahi işlem öncesinde hiçbir anti-kanser tedavisi almamış olan göğüs kanserli hastalar üzerinde yapılan bazı çalışmalar sonucunda sHLA-G miktarının kontrol grubuna oranla göğüs kanserli hasta grubunda daha yüksek çıktığı da saptanmıştır. Bu çalışmalarda tüm aşamalarda göğüs kanseri hastalarında genel olarak kontrol grubuna oranla hasta grupta sHLA-G yüksek miktarda saptanmıştır ancak özellikle IV. derece göğüs kanserli hastalarda diğerlerine oranla daha yüksek bir sHLA-G oranı bulunmuştur.

Konu üzerinde yapılan çalışmalar, çeşitli kanser türlerinin hemen hepsinde HLA-G ve sHLA-G miktarının sağlıklı kontrol grubuna oranla bir hayli yüksek oranda bulunduğunu göstermektedir. Birbirinden bağımsız araştırmacıların yürütmüş olduğu

farklı çalışmalar sonucunda elde edilmiş olan bulguların birbiriyle benzerlik gösterdiği görülmektedir.

## 2.7. NK Hücreleri ve KIR Reseptörünün Kanserli Dokular Üzerindeki Etkisi

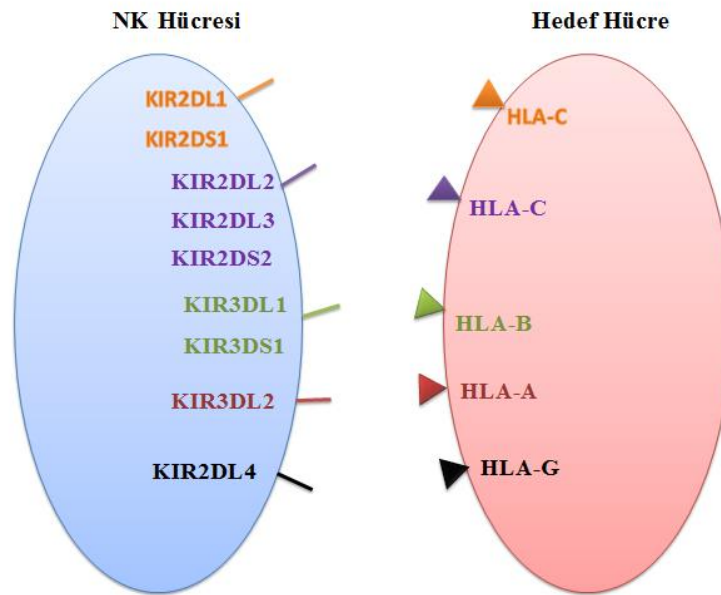
Killer cell immünoglobulin benzeri reseptörler (KIR'lar), NK'lar ve T hücrelerinin alt kümeleri tarafından ifade edilen transmembran glikoproteinlerdir. KIR genleri polimorfik ve oldukça homologdurlar ve kromozom 19q13.4 üzerinde bulunmaktadır. Birkaç gen bölgesi (KIR3DL3, KIR3DP1, KIR3DL4, KIR3DL2) tüm haplotiplerde bulunmasına rağmen KIR gen kümesinin gen içeriği haplotipler arasında değişmektedir (113). KIR proteinleri, hücre dışı immünoglobulin alanlarının (2D veya 3D) sayısı ve uzun (L) veya kısa (S) sitoplazmik alana sahip olup olmadıkları ile sınıflandırılmaktadırlar.

KIR2DL4; yapısı, ifadesi, hücrel lokalizasyonu ve sinyalleme özellikleri açısından oldukça değişik bir KIR ailesi üyesidir. Evrimde en çok korunan KIR genidir ve tüm NK hücreleri ve bir T hücre alt kümesi tarafından ifade edilmektedir. KIR2DL4, özgün NK hücreleri arasında çeşitli ifadeler sergileyen diğer KIR genlerinden farklı olarak, tüm NK hücreleri ve tüm KIR haplotipleri tarafından yapısal olarak ifade edilmektedir (114). Bu reseptörün ligandı ile birleşmesi, NK hücrelerden sitokin ve kemokinlerin salgılanmasına sebep olmaktadır ancak sitotoksositeye sebebiyet vermemektedir. KIR2DL4'ün bilinen tek ligandı ise klasik olmayan HLA sınıf I molekülü olan HLA-G'dir. NK hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen diğer KIR'lardan farklı olarak KIR2DL4, endozomlarda bulunmaktadır. Çözünür HLA-G (sHLA-G) ise, KIR2DL4<sup>+</sup> endozomlarında birikmektedir (115).

KIR2DL4 (2DL4; CD158d), KIR ailesi üyeleri arasında yapısal ve işlevsel olarak benzersizdir. Çalışmalar, 2DL4'ün, analiz edilen tüm NK hücre klonlarında mRNA'nın ifade edildiği tek KIR olduğunu ve bunun, biyolojik olarak önemli bir işlevselliğe hizmet ettiğini kuvvetle göstermektedir. 2DL4 ayrıca, IFN- $\gamma$  üretimini tetikleyen ancak istirahat halindeki NK hücrelerinde hedef hücre sitotoksitesini tetiklemeyen tek NK hücresi aktive edici reseptör olarak öne çıkmaktadır. Aksine, diğer NK hücresi aktive edici reseptörler, hem IFN- $\gamma$  üretimine hem de sitotoksositeye yol açan bir fonksiyonel yanıt programı oluşturmaktadırlar (116).

NK hücreler tarafından ifade edilen KIR baskılayıcı reseptör ailesi, çevrelerinden aldıkları sinyallere karşı duyarlılıklarını düzenlemektedirler. NK hücreleri, tümör hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreler veya sitokinler, kemokinler ya da diğer çözünebilir ligandlar gibi diğer hücrelerle temasa tepki vermektedirler. KIR, hedef hücrelerin yüzeyindeki ana HLA ligandlarının tanınması üzerine NK hücrelerinin aktivasyon/inhibisyon durumunu düzenlemektedir (117). KIR reseptörlerinin buradaki önemi, kendinden olan hücreleri klasik veya klasik olmayan HLA Sınıf I moleküllerinin varlığıyla ve yabancı hücreleri ise bu moleküllerin olmaması ile ayırt edebilmesidir.

Kanser hücrelerinin immüno-gözetim ve düşman saldırısının üstesinden gelmek için kullandıkları olası mekanizmalardan biri olan HLA-G ifadesiyle ilgili çalışmalar, HLA-G ve KIR2DL4 (CD158d) arasında doğrudan bir etkileşim olduğunu göstermiştir. KIR2DL4'ün, HLA-G'ye bağlanarak NK hücre aracılı sitolitik aktiviteyi baskılayan öldürücü hücre baskılayıcı reseptörleri gen ailesine ait olduğu gösterilmiştir (Şekil 2-13) (118).



Şekil 2-13: KIR reseptör ve ligandları

NK hücreler ( $CD56^+CD3^-$ ), geleneksel olarak, kötücül ve enfekte olmuş hücelere karşı sitotoksiste gösterebilen ve immün yanıtı şekillendirmek ve yönlendirmek üzere sitokin ve kemokin salgılayan büyük granüler lenfositler olarak tanımlanmaktadır (119). Birçok tümör hücresi, sitolitik T hücresi krizinden kaçmayı

kolaylaştırmak için HLA sınıf I moleküllerinin ifadesini azaltmaktadır; ancak bununla birlikte, bu süreç NK hücre aracılı lizise karşı duyarlılıklarını artırmaktadır (120). Bu nedenle birçok kanser türünde kanser hücreleri, yüzeylerindeki HLA-G ifadesini artırmaktadırlar. Böylece, HLA-G'ye spesifik olan KIR2DL4 geni, HLA-G ile birleşerek, HLA-G'nin endotel hücreler gibi profesyonel antijen sunucu hücreler, T hücreleri ve NK hücreleri ile direkt etkileşime girerek onların baskılanmasını sağlamaktadırlar.

Sonuç olarak, hedef hücreler üzerindeki HLA sınıf I molekülleri ile NK hücreleri tarafından ifade edilen KIR ailesi üyeleri arasındaki etkileşimler, NK hücresi immün gözetiminin ve NK hücre aracılı sitotoksitenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu mekanizma dolayısıyla, kanser hücreleri yüzeylerinde bir HLA Sınıf I molekülü alt grubu olan ve özellikle KIR ailesinin bir üyesi olan KIR2DL4 reseptör geni ile etkileşime giren HLA-G molekülünün ifadesini artırarak, kanser hücrelerinin NK'lar gibi profesyonel antijen sunucu hücrelerden kaçışına sebep olmaktadır.

## **2.8. İmmünohistokimya Yöntemi**

İmmünohistokimya tekniği, bir hücre veya dokuda özel bir antijeni (protein), reseptörü ya da hücreyi arama ve radyoaktif olmayan çeşitli işaretleyiciler yardımıyla dokularda bulunan birtakım proteinlerin buldukları yerde, ışık mikroskopik seviyede görünebilir hale getirildiği bir yöntemdir. Yöntem tek aşamalı ya da iki aşamalıdır. Teknik genel olarak lam hazırlama (örneğin sabitlenmesi ve dokunun hazır hale getirilmesi), reaksiyon ile ilgili aşamalar (antijen geri kazanılması ve antikor muamelesi), değerlendirme, yorumlama ve analiz aşamalarından oluşmaktadır. Bu yöntemde yaygın olarak parafin kesitler ve bunun dışında ise dondurma kesitler kullanılmaktadır. Parafin kesitlerin kullanıldığı çalışmalarda, dokunun doğru bir işleme fikse edilmesi ve yüksek ısıya maruz kalmasına engel olunması bir hayli önemlidir. Böylelikle dokuya ait antijenik yapı korunmuş olur. Tüm doku ve vücut sıvıları materyellerinde uygulanabilmektedir. Bu materyellerdeki hücrelerin özellikle sitoplazmalarındaki filamentler, mikrotübüller, mikrofilamentler, nörofilamentler ve hücre zarı reseptör proteinleri incelenmektedir. Bu yapılar antijen kabul edilerek; anahtar-kilit, koenzim-substrat örneğinde olduğu gibi dışarıda özel olarak üretilen antikorlar ile



oluşturulan antijen-antikor kompleksi özel boyalar ile boyanmakta ve sonuç olarak da bu kompleks görülür hale getirilmektedir.

Doku işlenirken, yüksek sıcaklık koşulunda parafin ile kaplanmaktadır. Örnek içeren parafinler, 3 ile 7 mikrometre kalınlık arasında olacak şekilde dilimlenerek polilizin gibi bağlayıcılar ile hazırlanmış lamların üzerine yerleştirilmektedirler. 3 mikrometreden ince parçalar zayıf reaksiyon göstereceğinden ve 7 mikrometreden daha kalın parçalar ise dokunun bir bölümünün görüntülenememesine neden olabileceğinden dolayı dokuların bu aralıktaki bir kalınlıkta kesilmeleri oldukça önemlidir. Antikorların örneğe bağlanmasının ardından, mikroskopta görüntü alabilmek amacıyla, doku üzerine Avidin-Biotin Enzim Kompleksi (ABC) ve Labeled Streptavidin-Biotin kompleksi (LSAB) uygulanmaktadır. Avidin, biotin için 4 bağlanma bölgesine sahiptir ve biotine karşı ilgisi olan bir glikoproteindir. Streptavidin bakterial bir proteindir ve yüksüz bir molekül olması, özgül olmayan elektrostatik bağlanmaların az olması ve daha az spesifik olmayan boyama yapması nedeniyle avidin yerine kullanılır. Burada biotinlenmiş enzim (Horseradish Peroksidaz (HRP) veya Alkalın Fosfataz (AP)) ve avidin bir enzim kompleksi oluşturur ve avidin-biotin-enzim kompleksi biotinlenmiş sekonder antikor ile bağlanır. İşaretlenmemiş primer antikor ilavesi yapıldıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikor, primer antikora bağlanır. Avidin-biotin-enzim kompleksi ilave edilerek biotinlenmiş sekonder antikora bağlanması sağlanır. Kromojen solüsyonu ise en sonda ilave edilir. Bu oluşan kompleksin, ışık mikroskopu altında görünür hale gelebilmesi için birtakım işaretleyiciler uygulanmaktadır. Burada uygulanan işaretleyicilere göre bu yöntem üçe ayrılır:

**1. İmmüenzim Yöntemi:** Burada işaretleyici madde olarak bir enzim kullanılmaktadır. Bu enzim, oluşan antijen-antikor kompleksinin görünür hale gelmesi için gereklidir. Bu enzim antikorlara kolay bir şekilde bağlanabilen, molekül ağırlığı düşük, suda, toluolde yada alkolde çözünmeyen yüksek düzeyde ürünler vermelidir. En yaygın kullanılan enzimler; horseradish peroksidaz, galaktozidaz, alkalın fosfataz ve glukoz oksidazdır.

**2. İmmünfloresan Yöntemi:** Bu yöntemde enzim kullanmak yerine aynı işlevi gösteren floresan maddeler kullanılmaktadır. Burada kullanılan ideal floresan madde yüksek oranda kısa dalga boyu ışınlarını absorblama özelliğine sahip olmalıdır. Bu yöntemde antikorlara bağlanan floresanlar, FITC (Fluorecein isothiocynate), TRITC

(tetramethylrhodomin), Fikoeritrin (PE) ve Akridin orange (AO) gibi fluorokromlardır. Antikorlara bağlı bulunan bu maddeler için uygun olan filtreler kullanılarak kırmızı, yeşil veya mavi renklerde fluoressan mikroskobunda gözlenir.

**3. İmmünaltın Yöntemi:**Bu yöntemde antikorlara işaret maddesi olarak kolloidal altın partikülleri bağlanır. Burada, gümüş tuzları ile yapılan bir indirgeme tepkimesi sonucualtın partiküllerinin gümüş metali ile kaplanmasıyla immün işaret alınır. Araştırılmakta olan proteinin ışık mikroskopu ile görülebilir hale gelmesi için çeşitli yöntemler kullanılır:

1. Direkt Yöntem
2. İndirekt Yöntem
3. Protein A yöntemi
4. İşaretlenmemiş antikor yöntemleri (Enzim-Anti-Enzim Yöntemleri)
5. İmmünaltın yöntemi
6. Avidin-Biotin Yöntemi

Yöntemde primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki çeşit antikor kullanılmaktadır. Primer antikorlar ise monoklonal ve poliklonal antikorlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Poliklonal antikorlar bir antijende birden fazla bölgeyi tanırlarken, monoklonal antikorlar ise antijende tek bir bölgeyi tanıyarak daha spesifik sonuçlar vermektedirler. Bu noktada yanlış veya hatalı antikor bağlanması sebebi ile sonucun hatalı olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla negatif ve pozitif kontroller kullanılarak örneklerle kıyaslanabilmektedir (121). Dokuda aranılan proteine karşı geliştirilmiş olan antikorlar protein ile bağlanarak bir antijen-antikor kompleksi oluşmaktadır.Oluşan bu kompleksin ışık mikroskopu altında gösterilebilmesi için birtakım işaretleyiciler kullanılmaktadır. Tek aşamalı yöntemde, sinyal oluşturan haberci moleküller işarete karşı oluşturulan primer antikora bağlanmaktadır. İki aşamalı yöntemde ise primer antikorun elde edildiği türe karşı oluşturulan sekonder bir antikor haberci molekölü taşımaktadır. İki aşamalı yöntem her bir primer antikora sinyal taşıyan birkaç sekonder antikorun birden bağlanabilmesi sebebiyle tek aşamalı yönteme göre daha duyarlıdır.

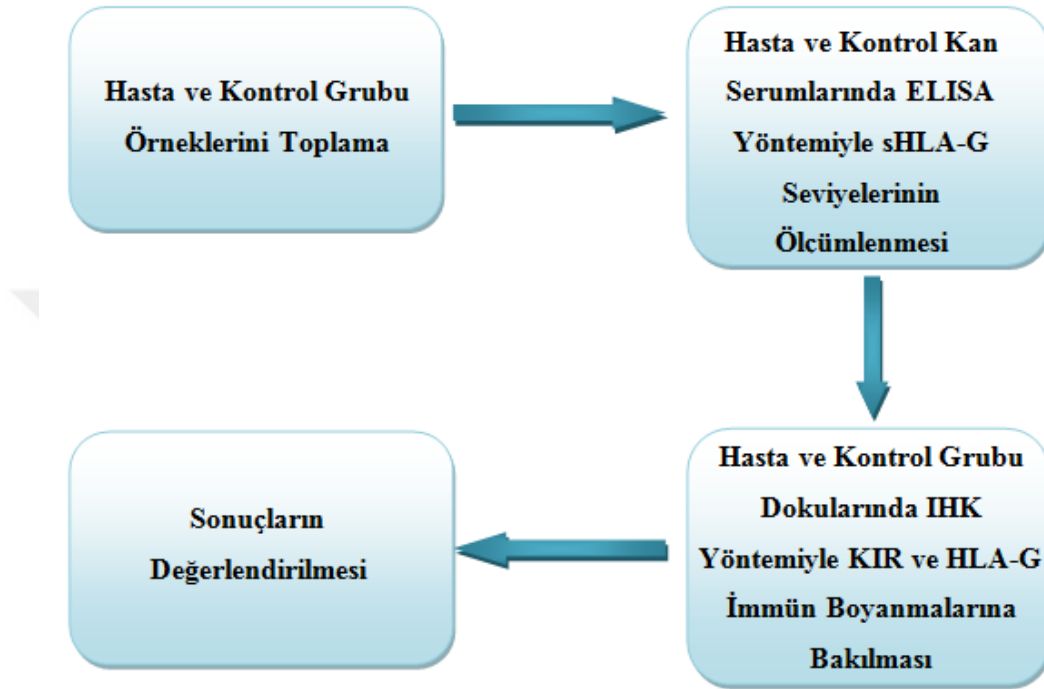
Burada en önemli noktalardan birisi, duyarlı ve spesifik birincil antikorlar kullanmaktır. Antikorun araştırılacak olan ilgili proteini tanıma yeteneği ve kapasitesi görüntünün kalitesini artırmaktadır. Bunun yanında, sekonder antikorlar da primer

antikorlara ve ışığa ile görüntülemeyi sağlayan florasan moleküllere bağlanarak, görüntünün mikroskop tarafından yakalanmasına sebep olduğu için uygun bir sekonder antikorun seçilmesi de analiz için bir hayli önem arz etmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmanın Kurgusu



Şekil 3-1: Çalışmanın Kurgusu

#### 3.2. GEREÇLER

##### 3.2.1. Hasta Grubu

Bu çalışmaya 2018 yılında İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği tarafından kolorektal kanser tanısı konmuş ve opere edilmiş 36 hasta (24 erkek ve 12 kadın) dahil edildi. Hasta grubuna dahil olan bireyler 18 yaşından büyük ve 90 yaşından küçük olacak şekilde seçildi.

Hastalardan ameliyat öncesi Genel Cerrahi servisinde 5cc bir kuru tüpe daha sonra çalışılmak üzere kan alındı. Çalışılacak olan kan örnekleri İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nden temin edildikten sonra, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na getirilerek çalışılmaya başlanana kadar uygun şartlarda (+4 °C) saklandı. Kuru tüplere alınan kan

örneklerinden laboratuvar ortamında elde edilen serumlar, daha sonra ELISA testi çalışılmak üzere uygun şartlarda (-20 °C) saklandı. Ameliyat sonrasında, hastaların tümör dokularından hazırlanmış parafin bloklardan alınan kesitler, tümör dokularında HLA-G ifade seviyelerini ve KIR molekülünün dokulara infiltrasyonunu göstermek amacıyla İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Birimi'nden alınarak İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda immünohistokimyasal boyama yapılmak üzere uygun şartlarda saklandı.

İstanbul Üniversitesi Tıp fakültesi Etik Kurulu'ndan 28.11.2016 tarihli 2016/1350 dosya nolu etik kurul onayı alındı. Çalışmaya sadece üst rektum bölgesi kanseri olan hastalar dahil edilerek, orta ve alt rektum kanseri olanlar neoadjuvan kemoterapi almaları nedeni ile çalışma dışı bırakıldı. Kolorektal kanser tanısına eşlik eden kolon ve kolon dışı herhangi bir organda başka bir neoplazi veya metastaz varlığı ile kemoterapi veya radyoterapi almış olan hastalar çalışmadan çıkarıldı.

### 3.2.2. Kontrol Grubu

Bu çalışmaya kontrol grubu olarak, bilinen herhangi bir akut veya kronik rahatsızlığı olmayan ve öyküsünde geçirilmiş herhangi bir hastalığı bulunmayan, 18 yaşından büyük ve 90 yaşından küçük, 40 sağlıklı birey (22 kadın ve 18 erkek) dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen kontrollerden 20 tanesinin biyopsi materyali mevcut olup hem ELISA, hem IHK çalışması yapıldı; biyopsi materyali mevcut olmayan ancak kan örneği mevcut olan 20 tanesi üzerinde ise yalnızca ELISA yöntemi uygulandı.

Kanser öyküsü bulunan, neoplastik lezyon içeren, daha önce kemoterapi veya radyoterapi tedavisi almış olan ve bilinen akut ya da kronik bir rahatsızlığı bulunan bireyler çalışmaya dahil edilmedi.

### 3.2.3. Çalışmada Kullanılan Genel Cihazlar

- Derin dondurucu (-20 °C) (Indesit)
- Buzdolabı (+4 °C) (Altus)
- Santrifüj (Makro) (Heraeus)

- Mikrodalga Fırın (Kenwood)
- ELISA Cihazı (BioTek)
- Etüv (37 °C) (Electro.mag M 420B)
- 1 adet Chamber
- Işık Mikroskobu (Leica)

### 3.2.4. Çalışmada Kullanılan Sarf ve Kimyasal Malzemeler

- Otomatik Pipet (10, 100 ve 1000 µl'lik)(Brand,HTL)
- Otomatik Pipet Ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik) (Ependorf)
- 100 ml'lik Cam Mezur
- Pastör Pipeti
- 15 ml'lik Falcon
- Etanol (Merck)
- Distile Su (dH<sub>2</sub>O)
- 1,5 ml'lik Ependorf
- 2,5 Lt Toluol (Merck)
- Şale
- 500 ml Citrate Buffer (Bio-Optica)
- HRP-AEC Kit (Thermo Scientific)
- HLA-G ELISA Kiti (YH Biosearch Laboratory)
- HLA-G Antikoru (4H84) (Santa Cruz)
- KIR2DL4 Antikoru (Biorbyt)
- 30 ml CC Mount Kapama Mediumu (Bio-Optica)
- 100 ad/pk Lamel (IsoLab)
- Parafilm
- Hematoksilen

### **3.3. YÖNTEM**

#### **3.3.1. Örneklerin Toplanması**

Kontrol ve hasta grubunda yer alan tüm gönüllü vericilerden bir kuru tüp içerisine periferik kan örneği alındı. Sağlıklı kontrollerden 2018 yılı Temmuz ayı içerisinde, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endoskopi Birimi'nde işlem öncesi kan örnekleri alındı. Doku örnekleri ise kolonoskopi işlemi sırasında sağ, orta ve sol kolon olacak şekilde sırasıyla alındı. Hasta grubunda yer alan gönüllülerden ise 2018 Haziran-Eylül ayları arasında, Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nde, cerrahi işlem öncesi İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümlerinde çalışılmak üzere kuru tüp içerisine periferik kan örneği alındı. Cerrahi işlem esnasında ise kanserli kolorektal dokudan parçalar alındı ve Patoloji Biriminde değerlendirildi. Kesin tanısı konulan parafin bloklardan immünohistokimya yapmak üzere kesitler alındı. İmmünohistokimyasal boyama işlemi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarları'nda yapıldı.

Tüm test işlemleri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda çalışıldı.

#### **3.3.2. ELISA Yöntemi alışma Prensipleri**

ELISA veya enzime bağlı immüno-sorbent testi veya analizi, bir örnekteki antikorları, proteinleri veya enfeksiyöz ajanları tespit etmek üzere laboratuvarlarda oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Bu test, insan serumu örneklerinde, kan plazmasında ve diğer ilişkili sıvılarda HLA-G antijenini tayin etmek üzere biyotin çift antikor sandviç teknolojisine dayalı bir ELISA kitidir. Bu testte 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğunun içi HLA-G'ye özđü monoklonal antikorlarla kaplanmaktadır. Standardlar, kontroller ve örnekler kuyucuklara eklenip, ardından inkübe edilerek serum örneklerinde mevcut olan HLA-G'nin kuyucukların dibinde daha önceden kaplanmış olan HLA-G monoklonal antikorlarına bağlanması sağlanır. Kuyucukları yıkama işleminin ardından, immün kompleksi şekillendiren streptavidin-HRP ile birleşmesi için biyotin ile işaretlenmiş anti HLA-G antikorları eklenerek tekrar inkübasyona bırakılır.





- Standart Sulandırıcı Tampon
- İnkübasyon Tamponu
- Yıkama Tampon Konsantresi (30X)
- Durdurma Solüsyonu
- Kromojen Reagent A ve B

### 3.3.2.3. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Otomatik pipet ve steril pipet ucu (10, 100 ve 1000 µl'lik)(Brand,HTL)
- 96'lık ELISA Test Plate
- 1,5ml'lik ependorf
- Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik)
- Buzdolabı (+4°C) (Arçelik)
- Vorteks(LMS VTX 3000L)
- ELISA Okuyucusu (BioTek)

### 3.3.2.4. ELISA Test Aşamaları

#### Standartların Hazırlanması

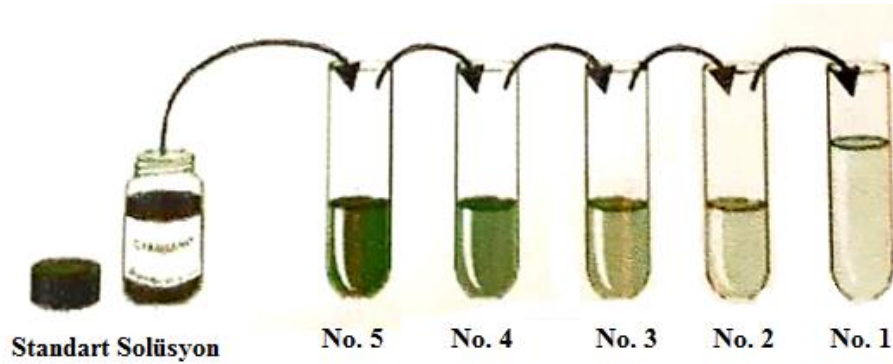
Standart sulandırıcı tampon ile dilüe edilmek suretiyle stok 1200 ng/L standart elde edildi. Standartlar hazırlandıktan sonra 15 dakika yavaşça karıştırıldı.

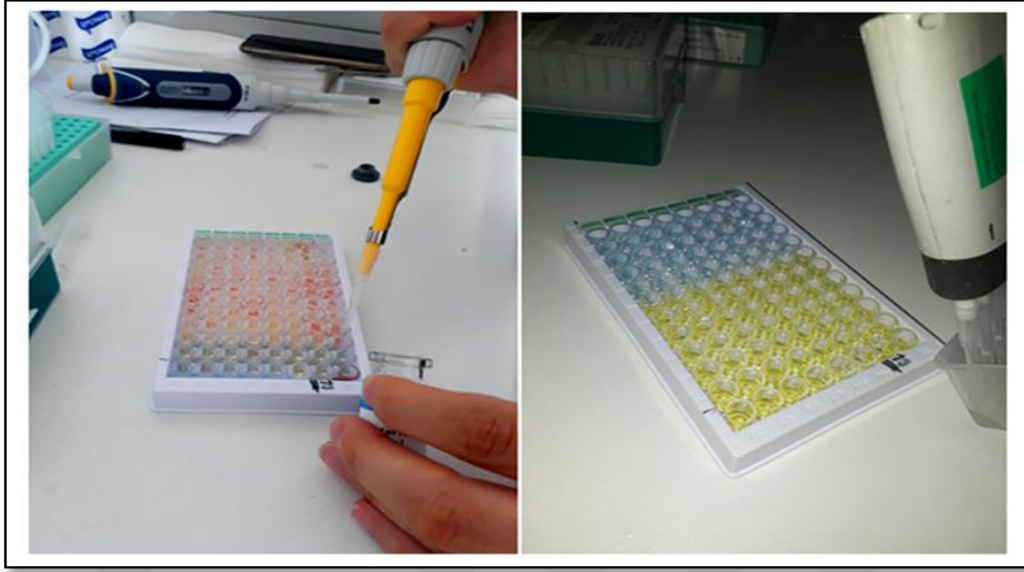
Sırasıyla 1200 ng/L, 600 ng/L, 300 ng/L, 150 ng/L, 75 ng/L konsantrasyonunda standartlar hazırlandı (Tablo 3-1).

Beş farklı mikrosantrifüj tüpüne 120 µl standart seyreltici konuldu. İlk tüpe stok (konsantrasyonu 1200 ng/L) standart çözeltisinden 120 µl eklendi ve böylece konsantrasyonu 600 µl olan standart elde edildi. Sırasıyla her standarttan 120 µl alarak standartın konsantrasyonu ½ oranında seyretildi (Şekil 3-3). Bu işlem seri dilüsyonlarla gerçekleştirildi ve her transferinde tüpler karıştırıldı (Şekil 3-4).

**Tablo 3-1: Standartların Hazırlanma Oranları**

Elde Edilen Standart Konsantrasyonu	Tüp numarası	Dilüsyon oranı
1200 ng/L	Standart No.1	120 µl orijinal standart + 120 µl standart seyrelticiler
600 ng/L	Standart No.2	120 µl standart No.1 + 120 µl standart seyrelticiler
300 ng/L	Standart No.3	120 µl standart No.2 + 120 µl standart seyrelticiler
150 ng/L	Standart No.4	120 µl standart No.3 + 120 µl standart seyrelticiler
75 ng/L	Standart No.5	120 µl standart No.4 + 120 µl standart seyrelticiler

**Şekil 3-3: ELISA çalışmasında standart solüsyonun seyreltilmesi**



**Şekil 3-4: Standartların Hazırlanması**

### **Test Prosedürü**

Hasta ve kontrollerden kuru tüpte alınan kandan serum elde edilerek çalışılacağı güne kadar  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Serumdaki sHLA-G düzeyi ELISA kiti (Human HLA-G ELISA Kit / PCR, Yehua) ile belirlendi. Testin standartları  $1200\text{-}75\text{ ng}/\mu\text{L}$  aralığındaydı. Serum örnekleri sulandırılmadan teste konuldu. İlk kuyucuk kromojen kontrol olarak bırakılarak onun dışındaki her kuyucuğa  $50\text{ }\mu\text{L}$  standart ve  $50\text{ }\mu\text{L}$  streptavidin-HRP eklendi. Uygun kuyulara hazırlanan hasta ve kontrol serumlarından  $40\text{ }\mu\text{L}$ , ardından  $10\text{ }\mu\text{L}$  HLA-G antikor ve  $50\text{ }\mu\text{L}$  streptavidin-HRP eklendi. En son kuyu (8. kuyu) kontrol olarak çalışılmış olup bu kuyuya yalnızca ELISA sulandırıcı eklenerek plak 5 dakika yavaşça çalkalandı. Plağın üstü plak kapatıcısı ile kapatılarak oda sıcaklığında 60 dakika boyunca inkübe edildi. Bir saatlik inkübasyonun ardından, her kuyucuk  $300\text{ }\mu\text{L}$  yıkama tamponu ile doldurulmak suretiyle kuyular yıkanıp aspire edilerek 5 kez yıkandı.

Plağın her kuyusuna ilk önce  $50\text{ }\mu\text{L}$  kromojen A ve ardından kromojen reagent B eklenerek karışması için nazikçe çalkalandı. Renk gelişimi için plaka karanlık ortamda  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra her kuyuya  $50\text{ }\mu\text{L}$  durdurma solüsyonu eklendi ve karıştırılarak kuyucuklardaki mavi rengin sarıya dönmeye

başladığı görüldü. Kontrol kuyucuğu ile sıfır ayarı yapılarak 450 nm’de absorbanlar okutuldu. Serum HLA-G düzeyi, standart kalibrasyon eğrisine göre hesaplandı.

### 3.3.3. İmmünohistokimya Yöntemi Çalışma Prensibi

Teknik genel olarak lam hazırlama (örneğin sabitlemesi ve dokunun hazır hale getirilmesi), reaksiyon ile ilgili aşamalar (antijen geri kazanılması ve antikor muamelesi), değerlendirme, yorumlama ve analiz aşamalarından oluşmaktadır. Bu yöntemde yaygın olarak parafin kesitler ve bunun dışında ise dondurma kesitler kullanılmaktadır (Şekil 3-5).

#### 3.3.3.1. Kullanılan Monoklonal Antikorlar

- İnsan Lökosit Antijeni-G (Human Leucocyte Antigen (HLA-G)) tayini için;
- Anti-HLA-G Monoklonal Antikor (4H84) , 200 µg , (katalog no: sc-21799)
- Doğal öldürücü hücre (Natural Killer (NK)) tayini için;
- KIR2DL4 Antikoru (Rabbit Polyclonal ) , 400 µl , (katalog no: orb39732)

#### 3.3.3.2. Kullanılan Solüsyonlar

- Toluol (Merck)
- Etanol (%100’lük, %96’lık ve %70’lik) (Merck)
- Distile Su
- Sitrat Tampon (10X) (Bio-Optica)
- Hidrojen Peroksidaz (Thermo Scientific)
- Ultra V Block (Thermo Scientific)
- PBS
- Sekonder Antikor (Biotinylated Goat Anti Polyvalent) (Thermo Scientific)
- Streptavidin Peroksidaz (Thermo Scientific)
- AEC Boya (Kromojen) (Thermo Scientific)
- Hematoksilen
- Glisin Jel

### 3.3.3.3. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

- Mikrodalga Fırın (Kenwood)
- Pastör Pipeti
- Otomatik Pipet ve Steril Pipet Uçları (10, 100 ve 1000 µl'lik) (Ependorf)
- Chamber
- 1 kutu Lam (IsoLab)
- 1 kutu Lamel (Deckglaser)
- Şale
- 100 ml'lik Cam Mezür
- 1,5 ml'lik Ependorf Tüp
- 15 ml'lik Falcon
- Etüv (Elektro-mag)
- Alüminyum Folyo
- Parafilm
- Hassas Terazî (Ohaus-Galaxy 400)
- Buzdolabı (+4 °C) (Arçelik)
- Derin Dondurucu (-20 °C) (Arçelik)

### 3.3.3.4. İmmünohistokimya Test Prosedürü

Parafin doku kesitlerine, HLA-G antikor ve KIR antikorları kullanılarak streptavidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama yapıldı (Şekil 3-6).

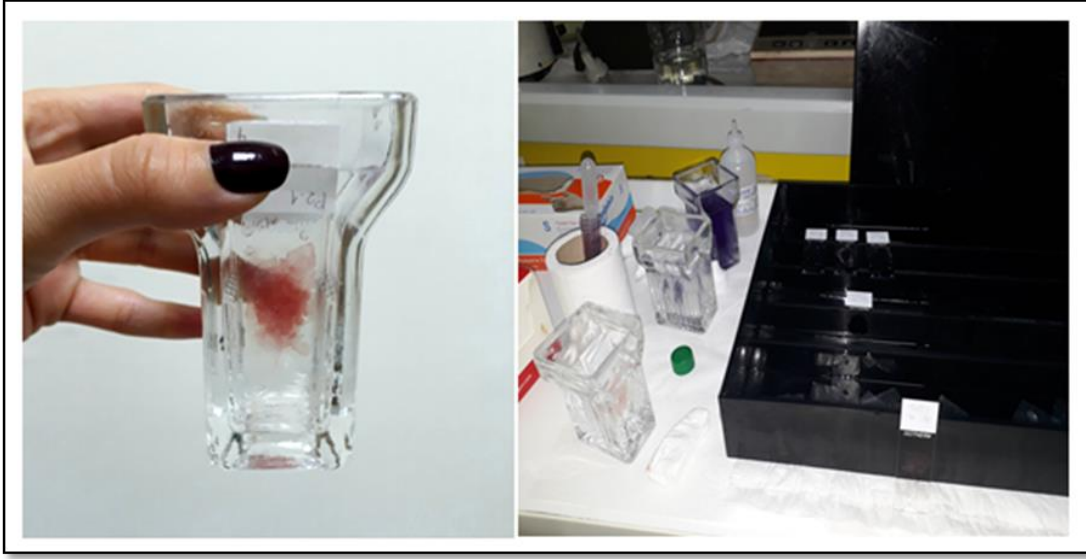


**Şekil 3-5: IHK çalışması yapılan hasta doku kesitleri**

İmmünohistokimya yöntemi için HRP/AEC Anti-Polyvalent Kit (Thermo Sci. UltraVision Detection System, Birleşik Krallık) ile insanlarda MHC kodlayan bir gen kompleksi çeşidi olan HLA-G antikorunu (Santa Cruz Biotech; Sc-21799, 1:50 dilüsyon) ve NK hücrelerin plazma membranı ve az sayıda T hücresi üzerinde ifade edilen tip I transmembran glikoproteini olan KIR antikorunu (Biorbyt; Orb39732, 1:7,5 dilüsyon) kullanıldı. Kit içinde tavsiye edilen boyama işlem dizini antikorlara göre bazı değişiklikler ile optimize edildi.

1. Önceden parafin bloklardan kesilerek lam üzerine sabitlenmiş olan dokular, parafinden kurtarılmak (deparafinize) amacıyla toluol içerisinde 1 saat 37 °C'de etüvde bekletildi.
2. Yeni toluol ile değiştirilerek yarım saat oda sıcaklığında bekletildi.
3. Kesitler inen alkol serilerinden geçirilerek (sırasıyla %100, %96 ve %70) distile suya indirildi.
4. Kesitler distile su ile 10 dakika yıkandı.
5. Kesitler antijen iyileştirmesi amacıyla mikrodalga içerisinde 3 kez 3 dakika sitrat tampon (pH: 6.0) ile kaynatıldı.
6. Kesitler soğuması için şale içerisinde oda sıcaklığında bekletildi ve 10 dakika distile su ile yıkandı.

7. Endojen peroksidazları maskeleyen amacıyla hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile 10 dakika muamele edildi.
8. Kesitler 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.
9. Kesitlerde zemin boyanmasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block uygulandı.
10. Ultra V Block dökülerek preparatlar kurulandı.
11. Kesitler üzerine uygun dilisyon oranında hazırlanmış olan primer antikorlar (HLA G için 1:50; KIR için 1:7,5) damlatıldı ve bir gece nemli immünohistokimya kabında  $+4\text{ }^\circ\text{C}$  buzdolabında bekletildi.
12. Preparatlar 3 kez 2 dakika süre ile PBS ile yıkandı.
13. Dokular üzerine tamamen kapatacak şekilde sekonder antikor (biotnylated goat anti polyvalent) damlatılarak 15 dakika bekletildi.
14. PBS ile 3 kez 2 dakika yıkama yapıldı.
15. Dokular üzerine 1'er damla streptavidin peroksidaz dökülerek 15 dakika bekletildi.
16. PBS ile 3 kez 3 dakika yıkama yapıldı.
17. Substrat-kromojen (AEC = 3-aminoetil 9-karbazol) solüsyonu ile 15 dakika renk reaksiyonu (kırmızı) gözlenene kadar bekletildi ve hemen ardından preparatlar distile su içerisine alındı.
18. Kesitlere zıt boyama yapmak için hematoksilen damlatıldı ve 45 saniye bekletildi.
19. Ardından çeşme suyu ile yıkandı ve PBS ile morartılarak distile su içerisine alındı.
20. Lamlar üzerindeki dokular gliserin jelatın jel damlatılarak kapatıldı.



**Şekil 3-6: IHC Testinden Görüntüler**

**İmmünboyama özgüllüğünün kontrolü:** İmmün boyamanın kontrolü için negatif kontrol kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak immünohistokimyasal işlem sırasında primer (birincil) antikor yerine PBS damlatılarak tüm işlem basamakları aynen uygulanmıştır.

#### **3.3.4. İstatistiksel Analiz**

Kontrol ve hastaların demografik verilerini değerlendirmek üzere tanımlayıcı istatistik yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen sayısal ölçümlere ait tanımlayıcı değerler ortalama, standart sapma, minimum, maksimum, median, mean olarak; kategorik yapıdaki verilere ait değişkenlerin istatistikleri ise sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Statistic Packet of Social Science (SPSS 21.0) yazılım programı kullanılarak yapılmıştır.

Tanımlayıcı analizler, descriptive fonksiyonu ile yapılmıştır. Verilerin istatistiksel analizinde sürekli veriler normallik dağılımı için Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak test edilmiştir. Verilerin, ortanca (min-max) veya ortalama değerleri  $\pm$  SD olarak verilmiştir. Normal dağılım gösteren veriler için gruplar arası karşılaştırmalarda Student t-testi yapılmıştır. İki sayısal değişken verilerin arasındaki ilişki analizlerinde Pearson Ki-kare ve korelasyonu testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen veri gruplarını analiz etmek için Mann-Whitney testi kullanılırken, kategorik veriler için ise



Fisher kesin ki-kare testi kullanılmıştır. Sonuçlar yüzde değerler şeklinde ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak 0,05 alınmış ve P değerleri  $<0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Demografik Veriler

Tez çalışmasına Bakırköy Dr. Sadi Konuk Genel Cerrahi birimi tarafından kolorektal kanser (KRK) tanısı konmuş ve opere edilmiş 36 hasta ve neoplastik lezyon içermeyen, bilinen herhangi bir akut veya kronik rahatsızlığı olmayan ve öyküsünde geçirilmiş herhangi bir hastalığı bulunmayan 40 sağlıklı birey dâhil edildi. 24 erkek (%66,7) ve 12 kadın (%33,3) KRK'li hasta grubuna dahil olurken, 18 erkek (%45,0) ve 22 kadın (%55,0) ise sağlıklı kontrol grubuna dâhil oldu. Çalışmaya dahil edilen KRK'li bireylerin yaş ortalaması  $62,33 \pm 11,49$  yıl (yaş aralığı 33-78; E/K: 24/12) iken kontrol bireylerinin yaş ortalaması  $50,03 \pm 11,30$  yıl (yaş aralığı 22-71; E/K: 18/22) olarak bulunmuştur (Tablo 4-1). Hasta ve kontrol grupları yaş ortalaması bakımından anlamlı sonuç vermektedir ( $p=0,001$ ). Bu durum kolorektal kanserin sağlıklı bireylere oranla yaşa bağlı olarak hasta grubunda artış gösteriyor olabileceği anlamına geliyor olabilir. Hasta grubuna ait demografik veriler Tablo 4-2'de verilmiştir.

**Tablo 4-1: Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş ve Cinsiyet Özelliklerine Göre Karşılaştırması**

	Hasta (n=36)	Kontrol (n=40)	P
<b>Yaş</b>	62,33 ± 11,49	50,03 ± 11,30	0,001
<b>Cinsiyet (K/E)</b>	12 (%33,33) / 24 (%66,7)	22 (%55,0) / 18 (%45,0)	0,068

KRK'li hasta grubundaki erkek bireyler %66,7 (n: 24/36), kontrol grubundaki erkek bireyler ise %45,0 olmasına rağmen istatistiksel olarak hasta ve kontrol grupları arasındaki kadın ve erkek bireyler arasında bir anlamlılık tespit edilmemiştir ( $p=0,068$ ).

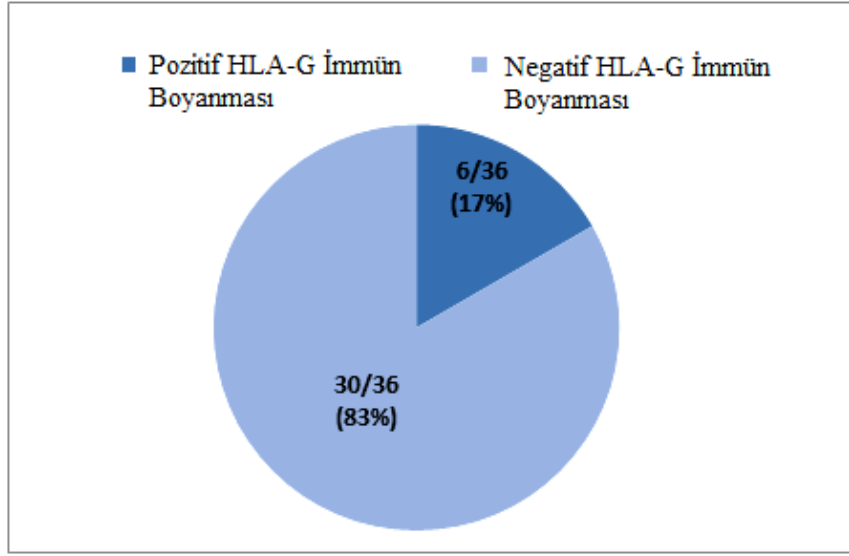
**Tablo 4-2: Hasta Grubu Klinikopatolojik Veri Skorları**

	Cinsiyet		Tümör Derinliği			Lenf Nodu Sayısı			Evrelendirme		Toplam
	Kadın	Erkek	T1-2	T3	T4	N0	N1	N2	Başlangıç Evresi	İleri Evre	
<b>Örnek</b>	12	24	4	24	8	18	6	12	18	18	36
<b>Yüzde</b>	%33,3	%66,7	%11,1	%66,7	%22,2	%50,0	%16,7	%33,3	%50,0	%50,0	%100

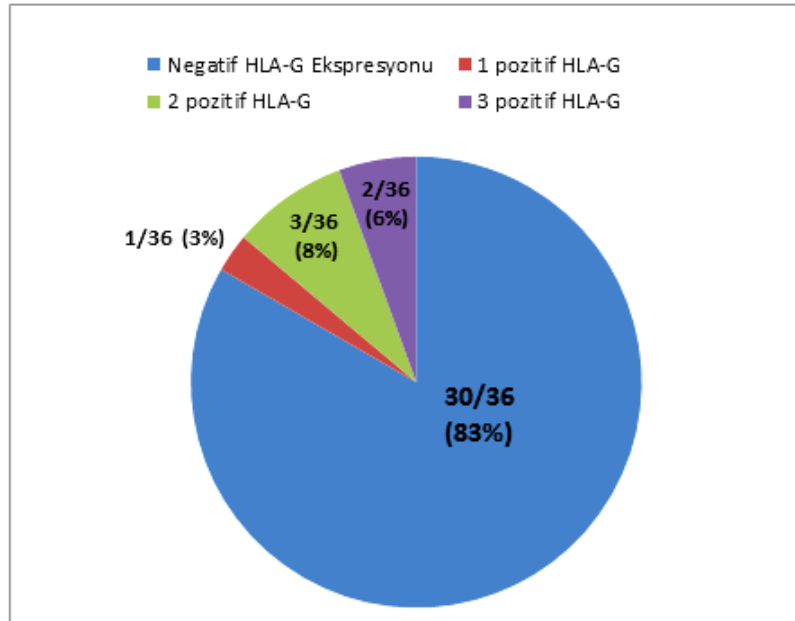
## 4.2. HLA-G İfadesi İncelemesi

### 4.2.1. Kolorektal Kanserli ve Sağlıklı Dokularda HLA-G İmmün Boyaması

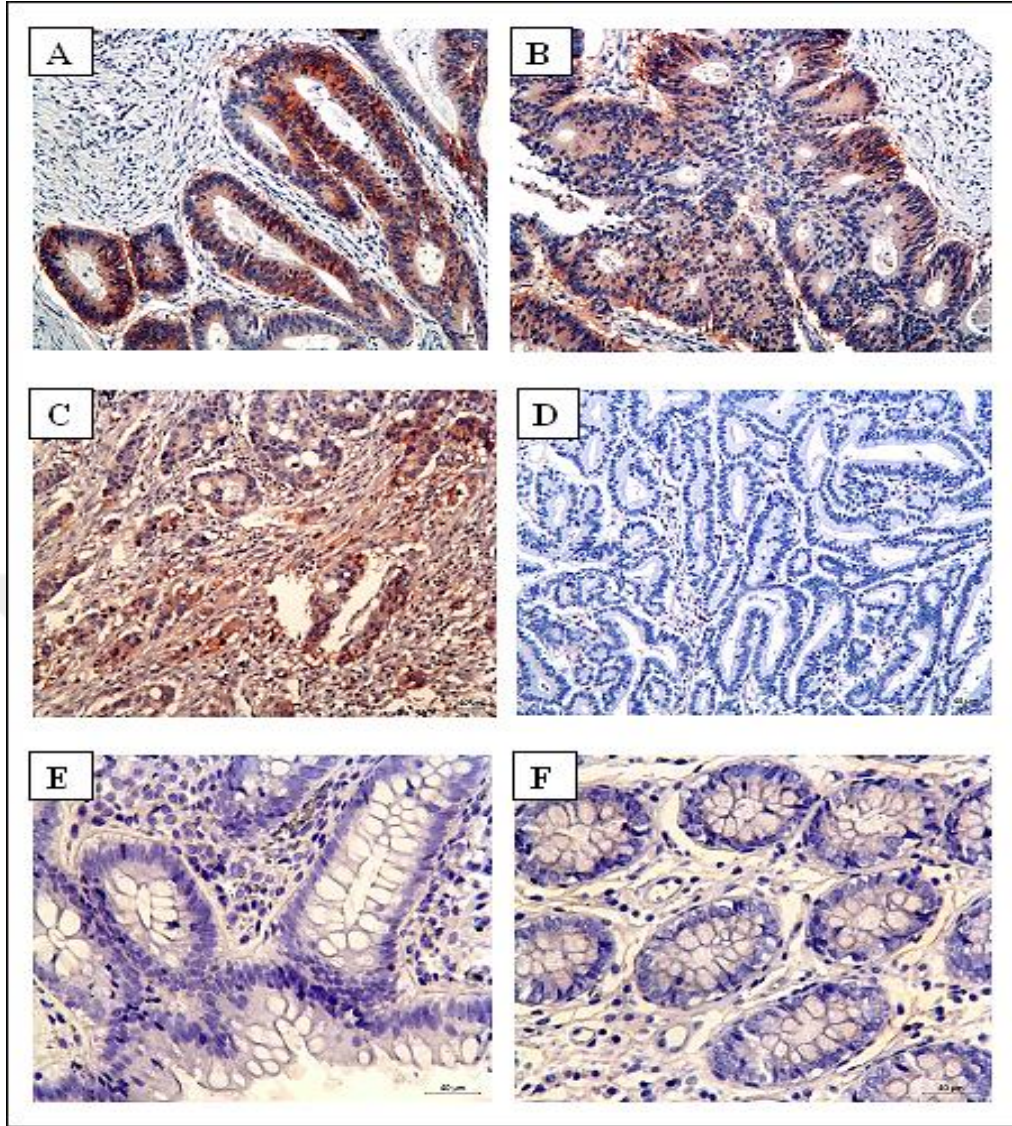
HLA-G antikoru kullanılarak immünohistokimyasal (IHK) boyama yapılan kolorektal kanserli I-III. evre tümörlere sahip 36 hastaya ait doku kesitlerinde, hücre membranları ve/veya sitoplazmaları boyanan hücreler HLA-G pozitif hücreler olarak kabul edildi. HLA-G ifadesinin IHK çalışmaları ile elde edilen mikroskopi görüntüleri Şekil 4-3'de gösterilmiştir. 40 adet normal (sağlıklı) kolorektal dokuda ve benign tümörlerde beklendiği üzere HLA-G pozitifliği gözlenmemiştir (Şekil 4-1) (Tablo 4-3). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, sağlıklı kontrol grubuna oranla hasta grubundaki 36 doku kesitinden 6'sında (%16,7) HLA-G immün pozitifliği gözlenirken, geri kalan 30 dokuda (%83,3) boyanma gözlenmemiştir (Tablo 4-3). Bu sonuca göre HLA-G immün pozitifliği hasta grubunda, kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p=0,009).



Şekil 4-1: Kolorektal kanserli grupta HLA-G İfadesinin Dağılımı



Şekil 4-2: Kolorektal kanserli grupta HLA-G İfadesinin Pozitiflik Derecelerine Göre Dağılımı



**Şekil 4-3: KRK'li ve sağlıklı dokularda pozitif ve negatif HLA-G boyanması**

**A, B ve C KRK'li dokuda pozitif HLA-G boyanması; D, KRK'li dokuda negatif HLA-G boyanması; E ve F, sağlıklı kolorektal dokuda negatif HLA-G boyanması**

**Tablo 4-3: HLA-G İfadesinin Hasta ve Kontrol Grubu Üzerindeki Dağılımı**

Hasta	Sayı (n)	Yüzde (%)	OR %95 CI	P
Boyanma Var	6	16,7	0,057 (0,003-1,069)	0,009
Boyanma Yok	30	83,3		
<b>Toplam</b>	<b>36</b>	<b>100</b>		
Kontrol	Sayı (n)	Yüzde (%)		
Boyanma Var	0	0		
Boyanma Yok	40	100		
<b>Toplam</b>	<b>40</b>	<b>100</b>		

İmmünohistokimyasal boyanma gösteren hasta ve sağlıklı kontrol dokularındaki HLA-G immün boyanma şiddeti üç grup altında incelenmiştir. Şekil 4-2’de gösterildiği üzere, immünohistokimyasal boyanma gözlemlenen 6 örnekten 1 tanesi zayıf boyanma (+) (%2,8), 3 tanesi orta şiddette boyanma (++) (%8,3) iken 2 tanesi ise şiddetli boyanma (+++) (%5,6) göstermiştir. Pozitiflik derecelerine göre değerlendirdiğimizde hasta ve kontrol grupları arasında HLA-G ifadesinde bir anlamlılık saptanmamıştır (Tablo 4-4). HLA-G genel anlamda hücre membranında ifade edilirken (%11,1), nadir olarak da soluk sitoplazmik boyanma (%2,7) olarak karşımıza çıkmıştır. Ayrıca tümör dokuları üzerinde yapılan IHK çalışmasında, erkek ve kadın bireylerde HLA-G ifade fazlalığı ya da eksikliği bakımından herhangi bir farklılık bulamadık. Bununla beraber, dokuların yalnızca %16,7’sinde HLA-G immün pozitifliği tespit edildi, elimizde bulunan verilerin yetersizliğinden dolayı hastalığın evresi ile HLA-G ifadesi arasında anlamlılık tespit edilememiştir.

**Tablo 4-4: Hasta ve Kontrol Gruplarında HLA-G İfade Pozitifliği**

	Hasta (n=36)	Kontrol (n=40)	OR %95CI	P
<b>Boyanma Yok</b>	30 (%83,3)	40 (%100,0)	0,057 (0,003-1,069)	0,009
<b>1 pozitif</b>	1 (%2,8)	0 (%0,0)	3,423 (0,135-86,778)	0,473
<b>2 pozitif</b>	3 (%8,3)	0 (%0,0)	8,463 (0,421-169,82)	0,101
<b>3 pozitif</b>	2 (%5,6)	0 (%0,0)	5,870 (0,272-126,55)	0,221

#### 4.2.2. HLA-G'nin Klinikopatolojik Parametreler ile Korelasyonu

Kolorektal kanserde HLA-G ifadesinin rolünü araştırmak için HLA-G immün pozitifliğinin yaş, cinsiyet, tümör derinliği, lenf nodu sayısı ve hastalığın histolojik derecesi gibi özellikler ile ilişkisini inceledik. Hasta grubu klinikopatolojik özellikleri ve HLA-G ifadesi ile ilgili veriler Tablo 4-6’da gösterilmiştir. Çalışmamızda hasta cinsiyeti (p=0,199), yaşı (p=0,358), tümör derinliği (T) (p=0,708), lenf nodu sayısı (N) (p=0,409) veya kanserin evresi (p=0,658) ile HLA-G ifadesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Kanser evreleri, hasta sayısının yetersiz olmasından dolayı

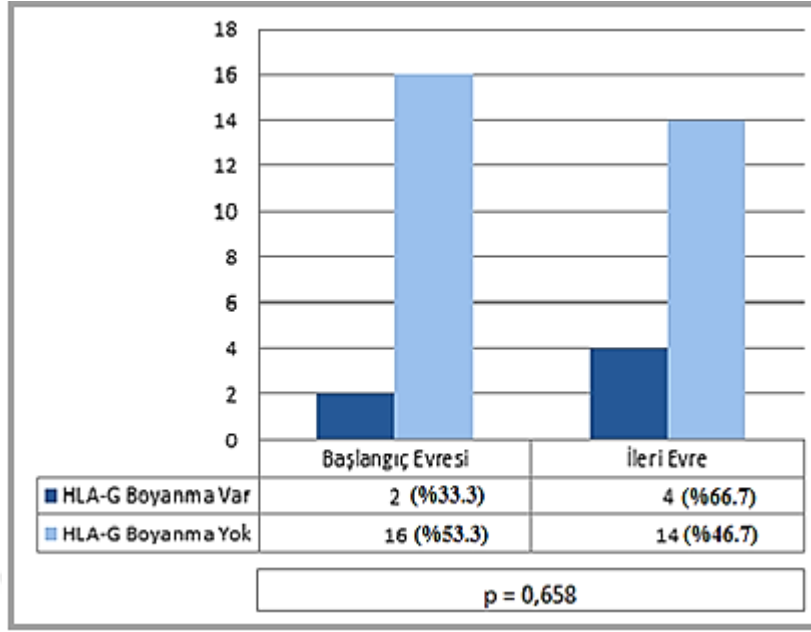
başlangıç ve ileri evre olacak şekilde iki gruba ayrıldığında, başlangıç evresindeki 18 hastanın yalnızca %5,6'sında (2/36) ve yine 18 ileri evre kanser hastalarının ise yalnızca %11,1'inde (4/36) HLA-G immün pozitif boyanması gözlemlenmiştir (Şekil 4-4). Bu sonuca göre kanserin evresi ve HLA-G arasında bir anlamlılık saptanamamıştır (p=0,658) (Tablo 4-5).

**Tablo 4-5: Kanserın derecesi ve HLA-G İfadesi Arasındaki Anlamlılık**

Kanserın Evresi	Boyanma Yok (n=30)	Boyanma Var (n=6)	OR %95 CI	P
I. Evre	3 (%10,0)	1 (%16,6)	0,555 (0,047-6,481)	0,534
II. Evre	13 (%43,3)	1 (%16,6)	3,824(0,396-36,854)	0,370
III. Evre	14 (%46,7)	4 (%66,8)	0,437 (0,069-2,763)	0,658

**Tablo 4-6: KRK'li Grupta HLA-G İfadesi ile Klinikopatolojik Parametreler Arasındaki İlişki**

Klinikopatolojik Parametreler	Örnek Sayısı	HLA-G İfadesi		P-değeri
		Boyanma Var	Boyanma Yok	
Yaş	36	66,33 ± 9,66	61,53 ± 11,8	0,358
Kolorektal Kanser Hastaları	36(%100,0)	6 (%16,7)	30 (%83,3)	0,573
Cinsiyet				
Kadın	12 (%33,3)	3 (%50,0)	9 (%30,0)	0,199
Erkek	24 (%66,7)	3 (%50,0)	21 (%70,0)	
Tümör Derinliği				
T1-2	4 (%11,1)	1 (%16,7)	3 (%10,0)	0,708
T3	24 (%66,7)	5 (%83,3)	19 (%63,3)	
T4	8 (%22,2)	0 (%0,0)	8 (%26,7)	
Lenf Nodu Sayısı				
N0	18 (%50,0)	2 (%33,3)	16 (%53,3)	0,409
N1	6 (%16,7)	1 (%16,7)	5 (%16,7)	
N2	12 (%33,3)	3 (%50,0)	9 (%30,0)	
TNM Evresi				
Başlangıç Evresi	18 (%50,0)	2 (%33,3)	16 (%53,3)	0,658
İleri Evre	18 (%50,0)	4 (%66,7)	14 (%46,7)	



Şekil 4-4: Kanserin evresi ve HLA-G ifade dağılımı

### 4.3. Öldürücü Hücre İmmünglobulin Benzeri Reseptör (Killer Cell İmmünoglobulin like Receptor-KIR) İmmün Boyanması İncelemesi

#### 4.3.1. KRK ve Sağlıklı Kontrol Grubu Arasındaki KIR İmmün Boyanma Farklılıkları

Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde daha önceden opere edilmiş 36 KRK hastası birey ile malign tümöre sahip olmayan kontrol grubundaki 40 sağlıklı bireyin dokuları üzerinde IHK yöntemi ile çalışılmıştır. Çalışmamızda HLA-G eşleniği olan KIR2DL4 antikoru kullanılmıştır.

Sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında KRK'li hasta dokularındaki KIR immün pozitifliğinin önemli ölçüde artış gösterdiği gözlenmiştir. Kötü huylu tümör kesitlerinde, boyanma yoğunluğunun aynı tümör içindeki tümörden tümöre ve bir alandan diğerine değiştiği belirlenmiştir. Çoğu KRK doku çeşidinde heterojen boyanma görülmüştür. Hem hücre zarında hem de sitoplazma bölgesinde yer yer zayıf veya kuvvetli pozitif boyanma gözlenmiştir.

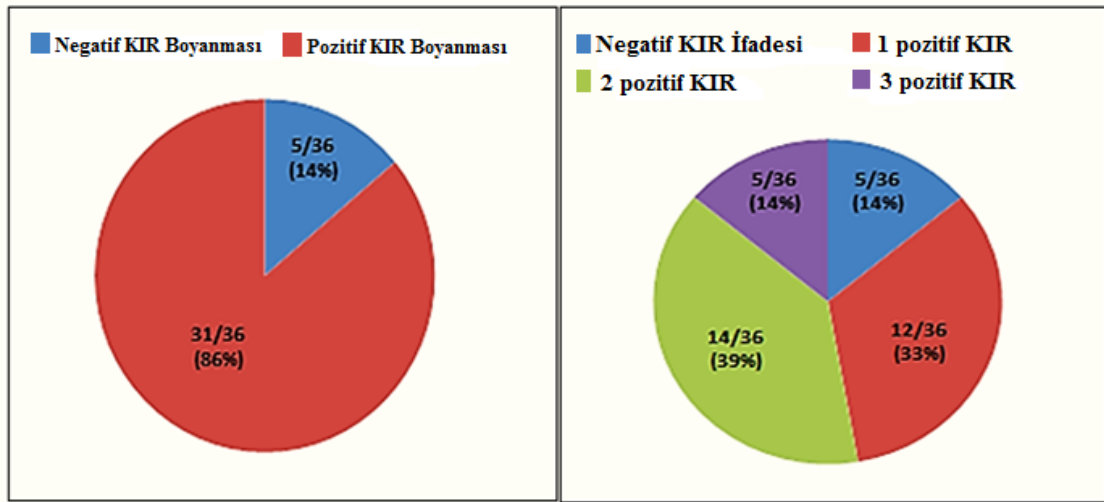
Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Şekil 4-5'te de görüldüğü gibi hastaların %86,1'inde (31/36) pozitiflik gözlemlenirken, yalnızca %13,9'unda (5/36) boyanma gözlenmemiştir. Kontrol grubundaki bireylerin ise hasta grubundakilerin aksine hiçbir boyanma ve KIR ifadesi belirtisi göstermediği gözlenmiştir (Şekil 4-6). Sonuçlar, hasta



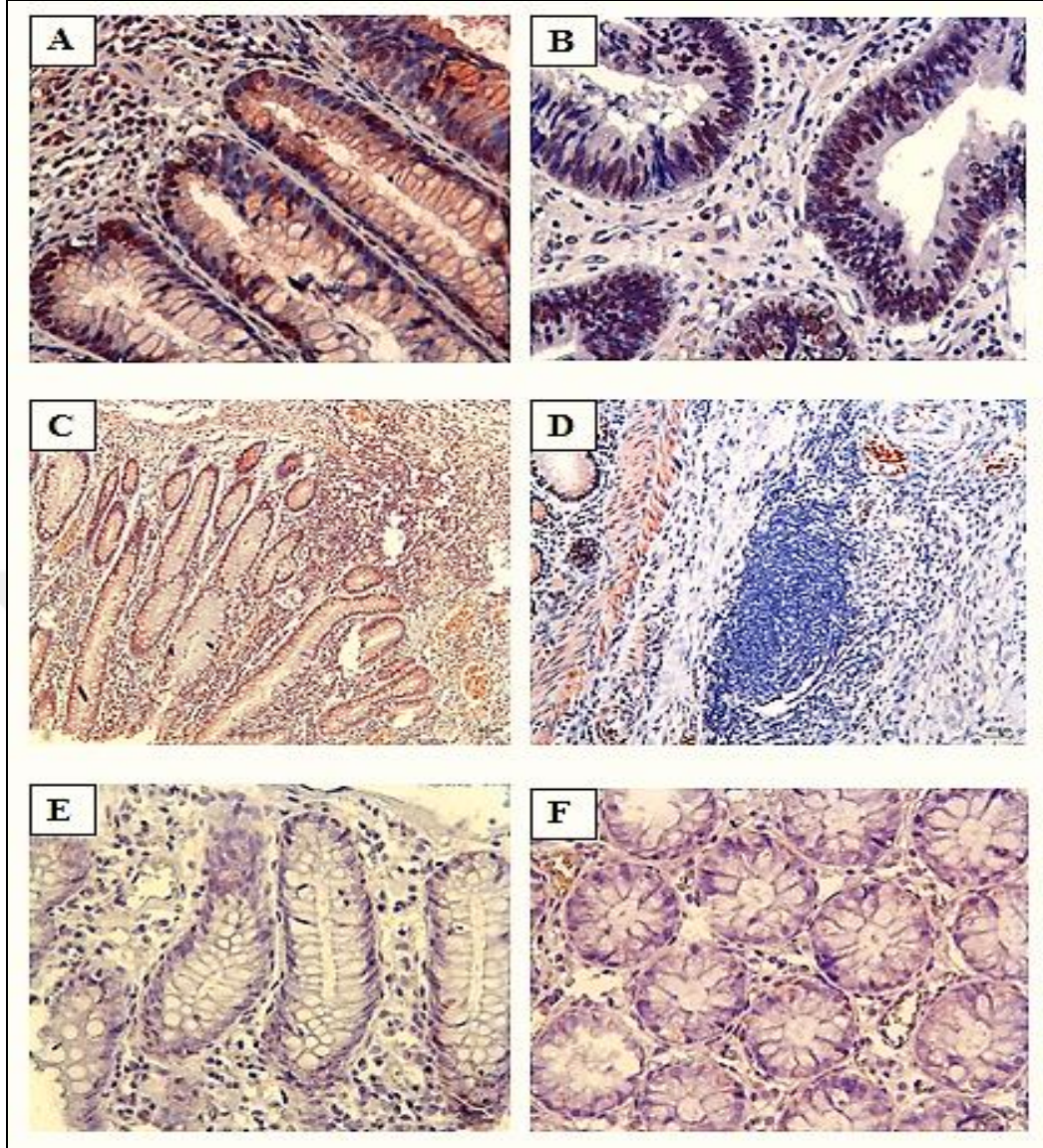
ve kontrol grubu arasındaki KIR ifade dağılımının anlamlılık ifade ettiğini göstermektedir ( $p<0,0001$ ) (Tablo 4-8). Bunun yanında kontrol grubuna oranla KIR ifade artışı gösteren hasta dokularındaki pozitiflik derecesi de istatistiki olarak incelenmiştir. Buna göre, pozitif boyanma gösteren hasta dokularından %33,3'ü (12/36) zayıf boyanma (+), %38,9'u (14/36) orta şiddetli boyanma (++) ve %13,9'u (5/36) ise kuvvetli boyanma (+++) göstermiştir (Tablo 4-7).

**Tablo 4-7: Hasta ve Kontrol Gruplarındaki KIR İfade Pozitifliği**

	Hasta (n=36)	Kontrol (n=40)	OR %95CI	P
<b>Boyanma Yok</b>	5 (%13,9)	40 (%100,0)	0,022 (0,002-1,001)	<0,0001
<b>1 pozitif</b>	12 (%33,3)	0 (%0,0)	2,667 (1,943-3,659)	<0,0001
<b>2 pozitif</b>	14 (%38,9)	0 (%0,0)	54,628 (3,104-961,55)	<0,0001
<b>3 pozitif</b>	5 (%13,9)	0 (%0,0)	14,607 (0,771-274,55)	0,018



**Şekil 4-5: KRK'li Grupta KIR İfadesi Dağılımı**



Şekil 4-6: KRK'li ve sağlıklı dokularda pozitif ve negatif KIR boyanması

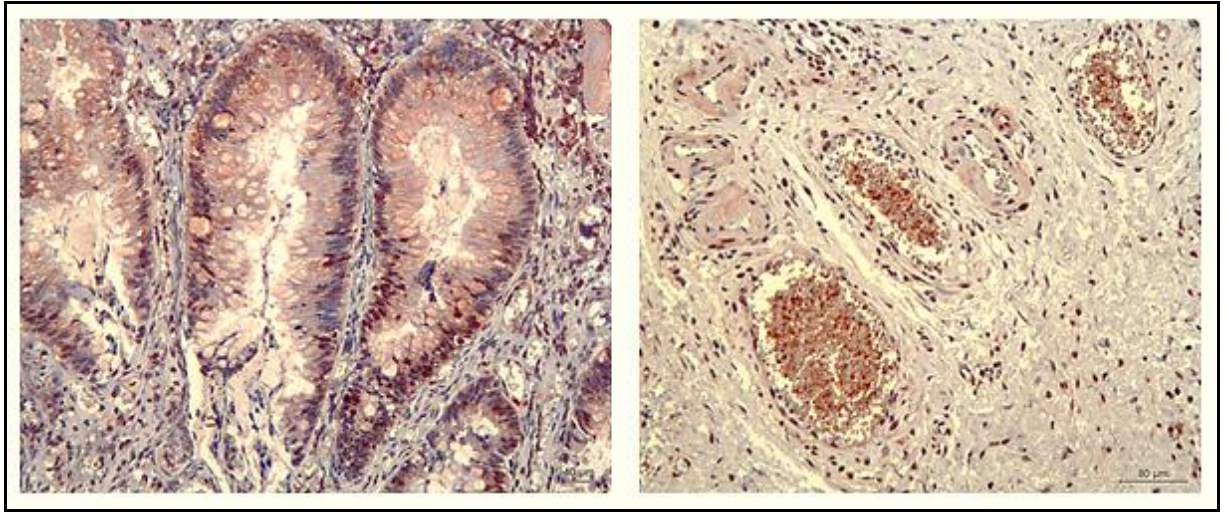
A, B ve C KRK'li dokuda pozitif KIR boyanması; D, KRK'li dokuda negatif KIR boyanması; E ve F, sağlıklı kolorektal dokuda negatif KIR boyanması

Tablo 4-8: KIR İfadesinin Hasta ve Kontrol Grubu üzerindeki Dağılımı

Hasta	Sayı (n)	Yüzde (%)	OR %95 CI	P
Boyanma Var	31	86,1	0,022 (0,002-1,001)	<0,0001
Boyanma Yok	5	13,9		
<b>Toplam</b>	<b>36</b>	<b>100</b>		
Kontrol	Sayı (n)	Yüzde (%)		
Boyanma Var	0	0		
Boyanma Yok	40	100		
<b>Toplam</b>	<b>40</b>	<b>100</b>		



KRK lezyonlarında görülen heterojen KIR boyanması çalışmamızda dikkatimizi çeken bir diğer noktaydı. Boyanmanın yoğunluğunun ve boyanma bölgesinin, aynı tümör içinde tümörden tümöre ve/veya bir alandan diğerine değişim gösterdiği gözlenmiştir. KIR ifadesi hücrelerde çoğunlukla hücre nükleusu ve membranında, daha az olarak hem nükleus ve membranda hem de sitoplazmada ve yer yer ise yalnızca sitoplazmada soluk boyanma olarak gözlenmiştir (Şekil 4-7).



**Şekil 4-7: KRK'li dokuda heterojen KIR boyanması**

#### 4.3.2. KIR İfadesinin Klinikopatolojik Parametreler ile Korelasyonu

KRK'de KIR ifadesi ile klinik patolojik parametreler arasındaki korelasyonu belirlemek üzere KIR ifadesi ile yaş, cinsiyet, nod sayısı, tümör derinliği ve hastalık TNM evresi gibi özellikler de incelenmiştir. Çalışmamızdaki 36 hastanın 4'ü I.derece (%11,1), 14'ü II.derece (%38,9) ve 18'i ise III.derece (%50) kolorektal kanser hastasıdır (Tablo 4-9).

**Tablo 4-9: Hastaların kanser evrelerine göre dağılımı**

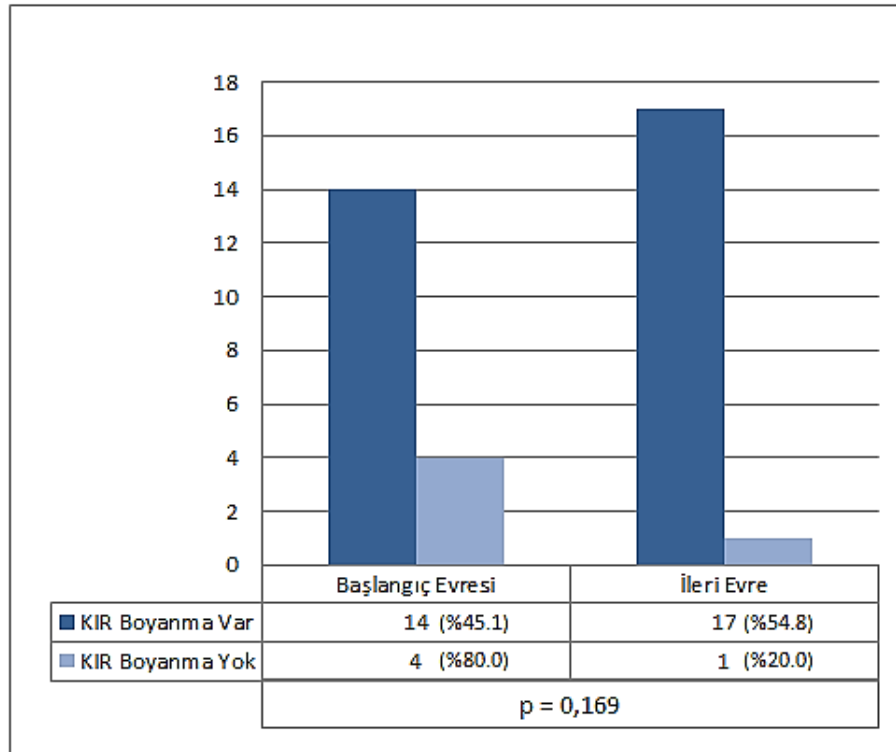
Kanser Evresi	Sayı (n)	Yüzde (%)
1	4	11,1
2	14	38,9
3	18	50
<b>Toplam</b>	<b>36</b>	<b>100</b>

**Tablo 4-10: Kanserin derecesi ve KIR İfadesi Arasındaki Anlamlılık**

Kanserin Evresi	Boyanma Yok (n=5)	Boyanma Var (n=31)	OR %95 CI	P
I. Evre	0 (%0,0)	4 (%12,9)	0,535 (0,025-11,457)	1,000
II. Evre	4 (%80,0)	10 (%32,3)	8,400 (0,827-85,276)	0,063
III. Evre	1 (%20,0)	17 (%54,8)	0,218 (0,021-2,196)	0,337

Tablo 4-10’da görüldüğü üzere üç gruba ayrılmış olan kolorektal kanser hastalarından I.evre’de olanların yalnızca %12,9’u boyanma gösterirken, II.evre’de olanların %32,3’ü ve III.evre’de olanlarınsa %54,8’i boyanma göstermiştir. Sonuçlarımızdan elde ettiğimiz istatistiksel veriler kanser evresi ve KIR ifadesi arasında anlamlılık bulunmadığını göstermektedir ( $p=0,122$ ). Ancak II.derece KKR hasta grubuna baktığımızda anlamlılığa oldukça yakın bir değer verdiği görülmüştür ( $p=0,063$ ).

I.derece kanserli hasta sayısının düşük olması dolayısıyla istatistiksel anlamda yeterli veri oluşturamayacağından dolayı, çalışmamızda hastalar başlangıç ve ileri evre olmak üzere iki grup altında toplanmıştır. Bu gruplandırmaya göre, çalıştığımız hastaların 18’i başlangıç evresi iken, 18 tanesi ise ileri derece kolorektal kanser hastasıdır. 36 KKR’li hasta içerisinde başlangıç evresinde olan 18 hastadan 4’ünde (%80,0) negatif sonuç alınırken, 14’ünde (%45,1) pozitif KIR boyanması gözlenmiştir. Benzer şekilde ileri derece KKR’li 18 hastanın yalnızca 1 tanesinin (%20,0) negatif sonuç verdiği ancak 17 tanesinin (%54,8) pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir (Şekil 4-8). Ancak bu sonuçlar, KKR’li hastalarda ifade edilen KIR belirtecinin, kanserin derecesi ile bir anlamlılık ifade ettiği hipotezini desteklememekle birlikte çalışmamızda KKR’li hastalardaki KIR ifadesinin TNM evresi ile ilişkilendirilemeyeceği görülmüştür ( $p=0,166$ ).



**Şekil 4-8: Evreye göre KIR ifadesi dağılımı**

Başlangıç ve ileri derece olarak evrelendirilmiş kanser hastaları gösterdikleri pozitiflik derecesine göre zayıf, orta ve kuvvetli pozitiflik olarak üç gruba ayrılmışlardır. Başlangıç evresinde olan 18 KRK'li hastanın %11,1'i (4/36) negatif, %13,9'u (5/36) zayıf pozitif (+), yine %13,9'u (5/36) orta dereceli pozitif (++) ve %11,1'inin (4/36) kuvvetli pozitiflik (+++) gösterdiği saptanmıştır. İleri derece KRK'li hastaların ise yalnızca %2,8'inde (1/36) boyanma gözlenmediği ancak %19,4'ünde (7/36) zayıf pozitiflik (+), %25'inde (9/36) orta dereceli pozitiflik (++) ve %2,8'inde (1/36) ise kuvvetli pozitiflik (+++) gözleendiği saptanmıştır (Tablo 4-11).

**Tablo 4-11: Kanser Evresine Göre KIR İfadesi Dağılımı**

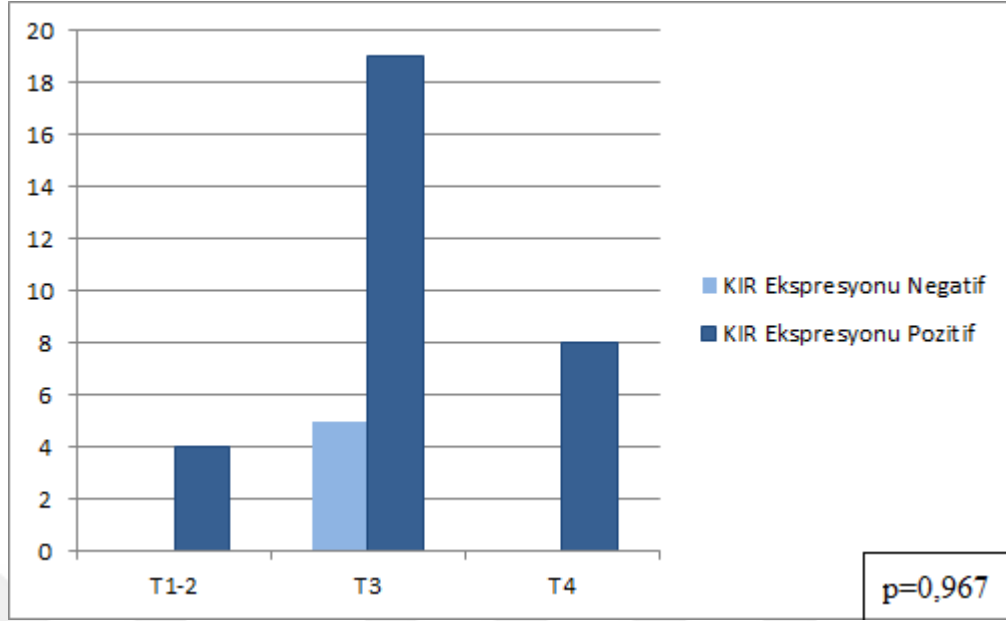
Kanserin Evresi	KIR İfadesi				OR %95 CI	P
	(-)	(+)	(++)	(+++)		
Başlangıç Evresi	4 (%11,1)	5 (%13,9)	5 (%13,9)	4 (%11,1)	0,218 (0,021-2,196)	0,166
İleri Evre	1 (%2,8)	7 (%19,4)	9 (%25,0)	1 (%2,8)		
<b>Toplam</b>	5 (%13,9)	31 (%86,1)				

Kolorektal Kanserli hastaların yaş, cinsiyet, tümör derinliği ve lenf nodu sayısı gibi diğer klinikopatolojik parametreler ile olan ilişkisi de çalışmamızda incelendi. 36 hastanın 12'si (%33,3) kadın ve 24'ü (%66,7) erkek hastadır. KRK'li kadın ve erkek hastalar arasındaki KIR ifade farklılıklarını incelediğimizde, kadın hastaların %83,3'ünde (10/12) pozitif KIR boyanması ve %16,7'sinde (2/12) ise boyanma görülmediği; bunun yanında erkek bireylerin ise % 87,5'inde (21/24) KIR pozitifliği ve yalnızca %12,5'inde (3/24) boyanma görülmediği gözlemlenmiştir. Sonuçlara göre kolorektal kanserli kadın ve erkek bireylerdeki KIR ifadesi dağılımında anlamlı derecede bir farklılık gözlenmemiştir (p=1,000) (Tablo 4-12). Hasta grubundaki bireylerde yaş (mean=62,3) ve KIR ifadesi arasındaki ilişkiyi incelediğimizde, KIR pozitifliği gösteren grubun 64,10±10,36 ve KIR ifadesi göstermeyen grubun ise 51,40±,35 ortalama ile bir anlamlılık ifade ettiği gözlenmiştir (p=0,020). Bu sonuca göre, yaş arttıkça hücrelerdeki KIR ifadesi da artış göstermektedir. Ancak hastaların yaşları ile kanser evresi arasındaki ilişkiyi incelediğimizde, başlangıç evresindeki 18 hastanın 61,17±14,25 ve ileri evredeki 18 kişinin ise 66,50±18,12 değerleri ile herhangi bir anlamlılık veya anlamlı bir korelasyon göstermediği saptanmıştır (p=0,550). Buradan, kolorektal kanserin yaş ile orantılı bir şekilde artış göstermediği ancak NK hücre yüzeylerindeki KIR ifadesinin yaşa bağlı bir artış gösterdiği sonucuna ulaşılabileceği düşünülmektedir.

**Tablo 4-12: KIR ifadesi ile Klinikopatolojik Parametrelerin Korelasyonu**

Klinikopatolojik Parametreler	Örnek Sayısı	KIR ifadesi				P-değeri
		(-)	(+)	(++)	(+++)	
<i>Cinsiyet</i>						
Kadın	12(%33,3)	2 (%5,6)	3 (%8,3)	3 (%8,3)	4 (%11,1)	0,099
Erkek	24(%66,7)	3 (%8,3)	9 (%25,0)	11(%30,6)	1 (%2,8)	
<i>Tümör Derinliği</i>						
T1-2	4 (%11,1)	0 (%0,0)	2 (%16,7)	1 (%7,2)	1 (%20,0)	0,967
T3	24(%66,7)	5 (%100)	7 (%58,3)	9 (%64,3)	3 (%60,0)	
T4	8 (%22,2)	0 (%0,0)	3(%25,0)	4 (%28,5)	1 (%20,0)	
<i>LenfNodu Sayısı</i>						
N0	18 (%50)	4 (%80,0)	5 (%13,9)	5 (%35,7)	4 (%80,0)	0,151
N1	6 (%16,7)	1 (%20,0)	3 (%8,3)	2 (%14,3)	0 (%0,0)	
N2	12(%33,3)	0 (%0,0)	4 (%11,1)	7 (%50,0)	1 (%20,0)	
<i>TNM Evresi</i>						
Başlangıç Evre	18 (%50)	4 (%80,0)	5 (%41,7)	5 (%35,7)	4 (%80,0)	0,166
İleri Evre	18 (%50)	1 (%20,0)	7 (%58,3)	9 (%64,3)	1 (%20,0)	

Hastaların T skorları ile KIR ifadesi birlikte değerlendirildiğinde, kolorektal kanserli hasta grubundaki 36 bireyden 4'ünün (%11,1) T1-2, 24'ünün (%66,7) T3 ve 8'inin ise (%22,2) T4 olarak saptandığı ve KIR ifade pozitifliği ile bir anlamlılık ifade etmediği belirlenmiştir (Şekil 4-9) (p=0,967). Çalışmamızdaki KRK'li hastaların nod sayısı ile KIR ifadesi arasındaki ilişkiye baktığımızda, 36 kişiden 18'inin (%50) lenf noduna sahip olmadığını (N0) ancak bunun yanında, 6'sının (%16,7) N1 ve 12'sinin (%33,3) ise N2 olarak derecelendirildiğini gözlemledik. Bu sonuçlara göre, lenf nodu sayısı ile KIR ifadesi arasında bir anlamlılık bulunmamaktadır (p=0,151).



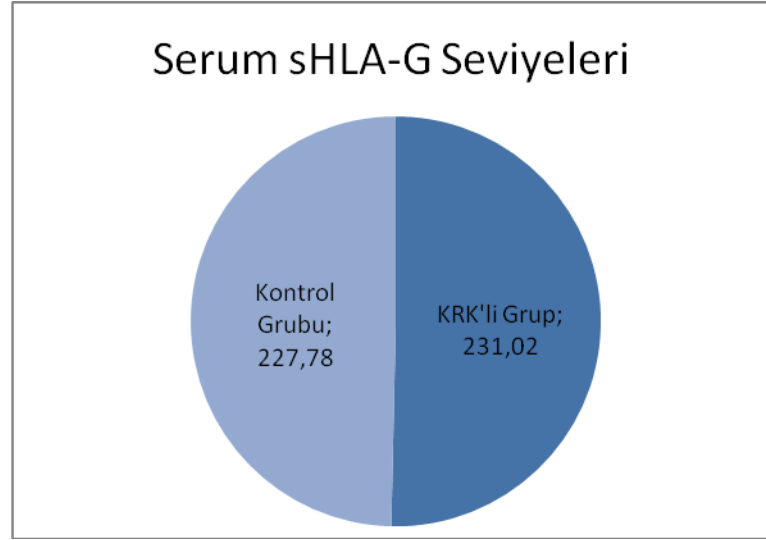
Şekil 4-9: Tümör derinliği ile KIR ifadesi arasındaki ilişki

#### 4.4. Serum sHLA-G Seviyeleri İncelenmesi

##### 4.4.1. Kolorektal Kanserli Hastaların ve Sağlıklı Kontrollerin Serumlarındaki sHLA-G İfade Seviyesi

Dolaşımdaki çözünür sHLA-G proteininin prognostik değerini belirlemek için, KRK hastalarının serum numuneleri analiz edilmiştir. 31 KRK hastası (sHLA-G ELISA testindeki 5 hasta kaybından dolayı; %13,9) ve 40 sağlıklı bireydeki serum sHLA-G düzeyleri ELISA testi ile belirlendi. İlk önce periferik kan serumlarındaki sHLA-G ile klinik patolojik parametreler arasındaki ilişkiyi inceledik. Serumdaki sHLA-G konsantrasyonu, KRK hastaları için median 227,78 ng/L (min/maks, 142,97 – 705,00) ve sağlıklı kontroller için ise median 231,02 ng/L (min/maks, 73,41 – 1035,00) olarak bulunmuştur (Tablo 4-13). Hasta ve kontrol serumlarındaki sHLA-G seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4-10) (p=0,871).





**Şekil 4-10: Hasta ve kontrol grubu serumlarındaki sHLA-G seviyeleri**

**Tablo 4-13: Çalışılan Hasta ve Sağlıklı Kontroller Arasındaki sHLA-G Anlamlılığı**

	sHLA-G				P
	Sayı (n)	Median	Minimum	Maksimum	
Hasta	31	227,78	142,97	705,00	0,871
Kontrol	40	231,02	73,41	1035,00	

Hastalığın evresi ile sHLA-G seviyeleri arasındaki anlamlılığı incelediğimizde, 4 bireyin (%12,9) I.evre KRK hastası, 12 bireyin (%38,8) II.evre KRK hastası ve 15 bireyin (%48,3) ise III.evre KRK hastası olduğu görülmektedir. Her bir evreye dahil olan bireylerin median sHLA-G seviyeleri sırasıyla I.evre için 214,81 (min/mak, 168,52-267,59), II.evre için 232,40 (min/mak, 169,44-697,50) ve III.evre için ise 225,93 (min/mak, 142,97-705,00) olarak bulunmuştur. Bunun yanında serum/plazmadaki sHLA-G seviyelerinin hastanın yaşı, cinsiyeti, tümörün derinliği (T) ve lenf nodu sayısı (N) ile ilişkili olmadığı saptanmıştır (Tablo 4-14). Dahası, 31 vaka içerisinde hasta dokularındaki HLA-G ifadesi ile serum sHLA-G seviyeleri arasında bir anlamlılık gözlenmemiştir (p=0,815).

**Tablo 4-14: Hasta Grubunda sHLA-G Seviyeleri ile Klinikopatolojik Parametrelerin Karşılaştırılması**

<i>Klinikopatolojik parametreler</i>	<i>Örnek Sayısı</i>	<i>sHLA-G Seviyesi</i>	<i>P- değeri</i>
<i>Cinsiyet</i>			
Kadın	10 (%32,2)	227,77 ± 38,62	0,306
Erkek	21 (%67,8)	283,87 ± 166,73	
<i>Tümör Derinliği</i>			
T1-2	4 (%13,0)	216,43 ± 41,18	0,762
T3	20 (%64,5)	271,69 ± 150,28	
T4	7 (%22,5)	277,06 ± 155,56	
<i>Lenf Nodu Sayısı</i>			
N0	16 (%51,7)	256,26 ± 121,94	0,299
N1	5 (%16,1)	202,66 ± 50,69	
N2	10 (%32,2)	312,55 ± 186,83	
<i>TNM Evresi</i>			
Başlangıç Evresi	16 (%51,7)	256,26 ± 121,94	0,704
İleri Evre	15 (%48,3)	275,92 ± 161,40	

Kanserin derecesine bağlı olarak değişen sHLA-G serum seviyelerinin, yaş ve hastalığın seyri ile ilişkili olduğu düşünülmesine rağmen, biz sHLA-G serum seviyeleri ile başlangıç ve ileri evre kolorektal kanserli hastaların yaşları arasında anlamlı bir korelasyon gözlemedik ( $p=0,467$  / Pearson Correlation=0,136).

#### **4.5. KIR, HLA-G ve sHLA-G İfade Seviyeleri ve Değerlerinin Birbiri ile Karşılaştırılması**

Yapmış olduğumuz IHK çalışmasının sonuçlarına göre hastaların %86,1'inde KIR pozitifliği gözlemlenirken, yalnızca %16,7'sinde HLA-G pozitifliği gözlenmiştir. Bunun yanında, hasta grubunda KIR belirtecini incelediğimizde, boyanan grupta pozitiflik derecelerine göre hastaların %38,7'sinin (12/31) zayıf pozitiflik (+), %45,1'inin (14/31) orta dereceli pozitiflik (++) ve %16,1'inin ise (5/31) kuvvetli pozitiflik (+++) gösterdiği ancak HLA-G ifadesine baktığımızda boyanma gözlenen hastaların %16,7'sinin (1/6) zayıf pozitiflik (+), %50,0'ının (3/6) orta dereceli pozitiflik (++) ve %33,3'ünün (2/6) ise kuvvetli pozitiflik (+++) gösterdiği gözlenmiştir. KIR teşhisi konmuş bireylerde HLA-G ve KIR ifadeleri arasında bir uyumluluk olabileceği

düşünülmesine rağmen biz çalışmamızda herhangi bir anlamlılık gözlemedik ( $p=0,566$ ) (Tablo 4-15).

**Tablo 4-15: HLA-G ve KIR Pozitiflik ve Negatiflik Değerleri**

	Boyanma Yok	Boyanma Var		
		(+)	(++)	(+++)
<b>HLA-G</b>	30 (%83,3)	1 (%16,7)	3 (%50,0)	2 (%33,3)
<b>KIR</b>	5 (%13,9)	12 (%38,7)	14 (%45,1)	5 (%16,1)

Her bir belirtecin kendi içerisinde ayrı ayrı incelenmesinin yanında, KIR, HLA-G ve plazma/serum sHLA-G seviyelerinin, kanserli hastalarda birbiri ile gösterdiği anlamlı veya anlamsız korelasyonun da önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda mevcut olan 36 hasta, ELISA testi esnasında meydana gelen 5 kayıp nedeniyle 31 hasta üzerinden değerlendirilmiştir. Öncelikle KIR değerlerini incelediğimizde, 31 hastanın 5'inin (%16,1) negatif sonuç verdiği ancak bunun yanında 26 hasta içerisinde 9 kişinin (%34,6) zayıf pozitif (+), 12 kişinin (%46,1) orta dereceli pozitif ve yine 5 kişininse (%19,3) kuvvetli pozitiflik gösterdiği gözlenmiştir. (%83,9) ise pozitif sonuç verdiği gözlenmiştir. Ayrıca hastaların KIR pozitiflik değerleri ile karşılaştırılan sHLA-G median değerleri sırasıyla, boyanma gözlenmeyen negatif 5 kişide 227,78 (min/mak, 169,44-241,67), zayıf pozitiflik gösteren 9 kişide 208,33 (min/mak, 142,97-271,3), orta derece pozitiflik gösteren 12 kişide 256,48 (min/mak, 164,81-705,00) ve kuvvetli pozitiflik gösteren 5 kişide ise 224,07 (min/mak, 218,52-293,52) olarak bulunmuştur. Sonuçları karşılaştırdığımızda, KIR ve sHLA-G değerleri arasında bir anlamlılık tespit edilmemiştir (Tablo 4-16) ( $p=0,707$ ).

HLA-G ifadesi seviyelerini incelediğimizde, 31 hastanın 26'sında (%83,9) negatif sonuç gözlemlenirken, yalnızca 5'inde (%16,1) boyanma gözlendiğini saptadık. HLA-G ifadesi gösteren 5 kişiden 3'ü (%60,0) orta derece pozitiflik ve yalnızca 2'si (%40,0) kuvvetli pozitiflik göstermiştir. Hastaların HLA-G pozitiflik değerleri ile karşılaştırılan sHLA-G median değerleri sırasıyla, boyanma gözlenmeyen negatif 26 kişide 228,24 (min/mak, 142,97-705,00), orta derece pozitiflik gösteren 3 kişide 205,56

(min/mak, 183,33-250,00) ve kuvvetli pozitiflik gösteren 2 kişide ise 247,22 (min/mak, 223,15-271,3) olarak bulunmuştur. Burada da HLA-G ve sHLA-G değerleri arasında bir anlamlılık tespit edilmemiştir (Tablo 4-16) ( $p=0,641$ ).

**Tablo 4-16: Hasta Grubundaki sHLA-G Seviyelerinin KIR ve HLA-G Belirteçleri ile İlişkisi**

	sHLA-G				P
	(-)	(+)	(++)	(+++)	
<b>KIR</b>					
<b>Sayı (n)</b>	5 (%16,1)	9 (%34,6)	12 (%46,1)	5 (%19,3)	0,114
<b>Median</b>	227,78	208,33	256,48	224,07	
<b>Minimum</b>	169,44	142,97	164,81	218,52	
<b>Maksimum</b>	241,67	271,3	705,00	293,52	
<b>HLA-G</b>					
<b>Sayı (n)</b>	26 (%83,9)	0 (%0,0)	3 (%60,0)	2 (%40,0)	0,641
<b>Median</b>	228,24	0	205,56	247,22	
<b>Minimum</b>	142,97	0	183,33	223,15	
<b>Maksimum</b>	705,00	0	250,00	271,3	

Kontrol grubu dokularında KIR ve HLA-G ifadesi, 40 sağlıklı bireyin tamamında negatif sonuç verdiği için sHLA-G değerleri ile anlamlılığına bakılamamıştır.

## 5. TARTIŞMA

Kolorektal Kanser (KRK), dünyada ve ülkemizde yaygınlık oranı her geçen yıl giderek artan, kanser türleri arasında dünyada ve Türkiye’de en yaygın 3. sırada yer alan önemli sorunlardan biridir. Dünya genelinde KRK, erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra en sık görülen 3. ve kadınlarda ise meme kanserinden sonra en sık görülen 2. kanser çeşididir, bu oran erkeklerde %10,9 iken, kadınlarda %9,5’tir. Dünyada en yaygın görülen 3. kanser tipi olmasına rağmen, kansere bağlı ölümler sıralamasında, kolorektal kanser 2. sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü istatistiksel verilerine göre, 2018 yılında dünyada 1,8 milyon kişi (toplamda %10,2) KRK; Türkiye’de ise 7,971 kişi (%7,34) yalnızca kolon ve 2,025 kişi (%1,87) yalnızca rektum kanseri sebebi ile yaşamını yitirmiştir (122).

Dünyanın farklı bölgelerinden birçok araştırmacının yoğun olarak yürütüyor olduğu KRK çalışmalarına ve kolorektal kanser terapisindeki gelişmelere rağmen beş yıllık sağ kalım oranı halen %65’tir (123). Bu nedenle, gelecekteki immün terapötik yaklaşımların umut vaat edici olabilmesi adına, bu alanda çok daha kapsamlı ve güncel çalışmalar yapılması gerekmektedir. Malign tümörlerin gelişiminde çoğu neoplastik hücre, bağışıklık hücrelerinden kaçabilmek için yüzey antijenleri ifade etmemekte ya da azaltmaktadırlar, bu nedenle bunlar yabancı olarak algılanmayarak konakçı tarafından ayrıştırılamamaktadırlar. Fakat etkili bir immün takip için tümör yüzey antijenleriyle birlikte HLA ifadesi de oldukça önemlidir. Bunun gibi tümör hücrelerindeki HLA antijenlerinin ifade seviyelerindeki farklılıklar bu hücrelerin, doğal bağışıklıktaki NK hücrelerinden kaçışına sebep olmaktadır. Kolorektal kanser, HLA-G’nin hücre yüzeyinde artışına, KIR’daki değişimlere bağlı NK hücre fonksiyonlarında bozulmaya ve immün sistemden kaçış gibi bireyin immün sisteminde çok sayıda değişikliklere neden olması sebebi ile araştırmacıların bu durumun kötü prognoz üzerinde etkisi olabileceği düşüncesine ulaşmalarına sebep olmuştur. Bu durum araştırmacıların dikkatini HLA grupları ve diğer immün hücre grupları üzerinde ifade edilen reseptörler üzerine çekmeyi başarmıştır. Tümör hücreleri tarafından ifade edilen HLA-G molekülüne dair yayınlanan ilk rapor, 1998 yılında melanoma hastaları üzerinde yapılan

bir çalışma ile sunulmuştur (88). O zamandan beri, konuya ışık tutabilmek adına çeşitli kanser türlerinde farklı HLA-G ifadesi seviyeleri tespit edilmiştir (108, 124).

HLA grupları ve KIR gibi bazı immün hücre yüzeylerinde yer alan reseptörler ile ilgili çeşitli ülkelerde yapılan birçok araştırma olmasına rağmen, ülkemizde konu ile ilgili yapılmış olan araştırma sayısı bir hayli düşüktür. Diğer kanser çeşitlerine oranla, özellikle kolorektal kanser teşhisi konmuş olan hastalarda yapılan çalışmaların yeterli seviyede olmaması, bu konuda literatüre bir katkı sağlamak amacıyla çalışma hedefimizi bu yöne doğrultmamıza sebep olmuştur. Biz bu çalışmada, kolorektal kanserli hasta grubunda, bir hücre yüzey belirteci olan HLA-G ifadesinin ve serumda serbest halde bulunabilen sHLA-G seviyelerinin kanserli ve sağlıklı dokudaki değişimlerini ve kan serumlarındaki seviyelerini karşılaştırarak bunların NK hücre yüzeyinde ifade edilen KIR reseptörlerine etkisini inceledik. Bu çalışmada, hastaların periferik kanlarından elde edilen serumlar ile sHLA-G seviyeleri belirlendi, hastaların doku grupları baz alınarak tümörlü dokuda HLA-G ifadesinin kayıp ya da yokluğu incelendi ve NK hücrelerinin KIR yüzey belirteçlerinin tümör dokusuna infiltrasyonu araştırıldı. Elde ettiğimiz veriler ile sağlıklı kontrol grubu verilerini karşılaştırmak suretiyle, hasta ve sağlıklı kişiler arasındaki HLA-G ve KIR reseptörleri ifade farklılıklarını ortaya koyduk. Bu çalışmanın kanserli hastaların teşhis ve tedavi sürecinde gelecekteki immün terapötik yaklaşımlar açısından umut vaat edici bir çalışma olmasını amaçlamaktayız.

Kişilere kolorektal kanser teşhisi konma sıklığının ileri yaşlarda artış gösterdiği dikkatleri çekmektedir. KKK teşhisi konmuş hastaların %90'ının genellikle 50'li yaşlardan sonra tanı aldığı saptanmıştır. Özkan ve arkadaşlarının, 123 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada tanı konulan hastaların yaş ortalaması 66'dır (125). Benzer şekilde Ye ve arkadaşlarının kolorektal kanser tanısı almış 106 erkek ve 95 kadın hasta üzerinde yaptığı çalışmada da tanı sırasındaki ortalama yaş 64'dür (108). Bizim hasta grubumuzda KKK tanısı konmuş 36 hastanın yaş ortalaması ise 62,3 olmakla birlikte kontrol grubunda bu oran 50,0'dır. Sonuçlarımız, hasta ve kontrol grupları arasında kolorektal kanser teşhisinin yaşa bağlı olarak arttığını, dolayısıyla bir anlamlılık ifade ettiğini göstermektedir (p=0,001). 40 yaş öncesi hastalarda kolorektal kanser daha nadir görülmeyle birlikte, genç popülasyonda son yıllarda kalıtsal sendromların eşlik ettiği agresif seyirli tümörler artış göstermektedir (126-128).

Çalışmamızda KRK'li olan grup cinsiyet bakımından değerlendirildiğinde hasta grubunun %66,7'sinin erkek, %33,3'ünün kadın olduğu tespit edilmiş ve erkek KRK hastalarının kadın hastalardan 2 kat fazla olduğu gözlenmiştir. Yüzde olarak hasta grubunu kendi içerisinde karşılaştırdığımızda, sayısal anlamda erkek hastaların kadın hastalara oranla çoğunlukta olduğunu gözlemlemiş olsak da hasta ve kontrol gruplarını kendi içerisinde cinsiyet bakımından karşılaştırdığımızda, hasta ve sağlıklı bireyler arasında kolorektal kansere yakalanma sıklığının genel anlamda cinsiyete bağlı olmadığını ve anlamlılık ifade etmediğini görmekteyiz ( $p=0,068$ ). Fakat p değerinin anlamlılığa yakın sonuç vermiş olması, bizi bu konuda daha fazla sayıda hasta ve sağlıklı birey ile yapılacak çalışmaların konuyu netleştirebileceği düşüncesine yönlendirmiştir. Yapılan diğer çalışmalar, KRK görülme sıklığının cinsiyete bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymuştur. Konuyla ilgili literatürler cinsiyet bakımından incelendiğinde oranların Türk popülasyonundakine benzer şekilde, farklı popülasyonlarda da erkeklerde artış gösterdiği yönündedir (129). Bu durumda örneklem seçimimizin Türkiye verileri ile karşılaştırıldığında genel anlamda tutarlı ancak yetersiz olduğu düşünülmektedir (130). Boyle ve arkadaşlarının KRK'nin epidemiyolojisi üzerine yaptıkları bir çalışmada kolorektal kanserin erkeklerde kadınlara göre 1,1 kat daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (131). Özkan ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları çalışmada ise bu oran 1,7 olarak bulunmuş olup kolorektal kanserli erkek hastaların oranı %62,6 iken, kadınlarda bu oran %37,4 olarak bildirilmiştir (125). Bunun yanında, Sağlık Bakanlığı'nın 2017 yılında yayınladığı kanser istatistikleri raporuna göre de kanser insidansı erkeklerde dünya insidansının üzerinde seyrederken, kadınlarda bu oran daha düşüktür (132). Yine aynı raporda 2014 yılı kanser istatistiklerine göre ülkemizde yaklaşık 96.213 erkek bireyin ve 67.203 kadın bireyin kansere yakalandığı belirtilmiştir. TÜİK'in 2014 yılında verdiği Ölüm Nedeni İstatistikleri raporuna göre, 6.786 kişi kolorektal kanserden hayatlarını kaybetmişken, bunun %57,1'i erkek ve %42,9'u kadındır (133).

Hasta grubumuzda yapmış olduğumuz histopatolojik değerlendirmede vakaların yalnızca %11,1'inin başlangıç evresinde olduğunu ancak %38,9'unun II.evre ve %50'sinin ise ileri evrede olduklarını gözlemledik. KRK teşhisi konmuş kişiler üzerinde yapılan birçok çalışma, başlangıç evresinden ileri evre kolorektal kanser teşhisi konulmuş vakaların çoğunlukta olduğunu göstermektedir. Özkan ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada teşhisi konulan olguların %60'ının ileri evre kolorektal kanser

vakası olduklarını belirterek çalışmamızla paralel sonuçlar gözlemlemiştir (125). Menon ve arkadaşlarının, 88 kolorektal kanser teşhisi koyulan hasta üzerinde yaptıkları çalışmada ise olguların %47'si II. evre ve %53'ü ise III. evre KRK teşhisi konmuş vakalardı (134). Yapılan çalışmalarda hastaların genellikle ileri evrede tanı almasının, hekime yapılan geç başvuru, başvuru alan hekimin tanıyı atlama ve/veya tarama testlerinin etkili bir biçimde kullanılmaması sebeplerine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu konunun aydınlatılabilmesi için daha ileri ve geniş çaplı araştırmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

Tümör hücrelerinin, hücre yüzeylerindeki HLA-G gibi klasik olmayan HLA Sınıf I moleküllerinin ifadesini düzenleme yetenekleri sayesinde kan dolaşımındaki NK hücre tanınmasını baskılayarak tümörlü hücrelerin immün takipten kaçışına sebep olduğu bulunmuştur (135). HLA-G kompleksi, immün homeostazında ve kanser immün gözetiminde önemli bir rol oynamaktadır ve hamileliğin erken dönemlerinde de immün toleransı düzenlediği ifade edilmiştir (136, 137). HLA-G, tümörde ve nadiren normal dokuda tespit edildiğinden dolayı tümör büyümesi ve ilerleyişi ile spesifik bir ilişkide olduğu varsayılmaktadır (138). İmmün sistemin, tümör gelişimi ve metastazının kontrolünde bu kadar önemli bir rol oynaması dolayısıyla, immün takipten kaçış ve immün sistemin baskılanması tümörün gelişimi süresince kanser hücrelerinin kazanmak zorunda oldukları 2 önemli özelliktir (139, 140). HLA-G'nin birbirinden farklı immün yeterlilikteki hücreyi baskılayarak immün toleran fonksiyon gösterdiği birçok farklı çalışmayla gösterilmiştir. Bu baskılama etkisi hem çözünür ve hem de membrana bağlı HLA-G'nin baskılayıcı reseptörlere bağlanması ile düzenlenmektedir. NK hücreleri tarafından ifade edilen KIR2DL4 (CD158d) ayrıca bir HLA-G spesifik reseptördür. Bu nedenle, HLA-G NK hücrelerini, T hücrelerini, ASH'ları ve bunun yanı sıra bu reseptörler aracılığıyla endotel hücreleri de içeren farklı immün hücre popülasyonları ile direkt olarak etkileşime girebilmektedir (141, 142).

Birçok çalışma B ve T hücre lenfomaları ile akciğer ve kolorektal karsinomalarını da içerisine alan çeşitli tümör tiplerinde HLA-G ifadesinin arttığını göstermiştir. Ye ve ekibi, kolorektal kanser dokularının %65'inde HLA-G ifadesi bulunduğunu tespit etmişlerdir (108). Grubun yaptığı çalışma ayrıca normal kolon-rektum veya kolorektal benign adenomun epitel hücrelerinin HLA-G antijeninin herhangi bir pozitif ifadesinden yoksun olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu ve diğer birçok çalışmaların sonuçları, HLA-G ifadesinin malign dönüşüm için oldukça spesifik bir



belirteç olduğu fikrini kuvvetle desteklemektedir (106, 109). Agaugue ve arkadaşları, spesifik antikorlar ile HLA-G fonksiyonunu bloke etmenin tümör gelişimini baskıladığını ortaya koyan çalışmalarıyla kanser için yenilikçi terapötik stratejilerin ortaya atılmasına neden olmuşlardır (143). Wischhusen ve arkadaşları da benzer şekilde diğer bazı HLA moleküllerinin aksine HLA-G'nin nadiren sağlıklı dokuda bulunduğunu, kanserli dokuda ise ifadesinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir (78). Bu sonuçlar, HLA-G ifade artışının KIR reseptörleri ile etkileşime girerek NK hücrelerinin baskılanmasına sebep olduğu görüşünü doğrulamaktadır. Bu nedenle, HLA-G'nin prognostik değeri üzerine yapılan çalışmalar, bu moleküllerin ifadesinin zayıf prognozla ve tümör gelişimiyle ilişkili olduğunu göstermektedir (108).

Tümör ve immünite etkileşimi, kanser hastalarının prognozu için önemli bir faktördür (144). Araştırmalar hücre yüzeylerindeki HLA-G ifadesinin yokluğunun, onları NK hücre ayrıştırımına karşı daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir (145). Fonksiyonel HLA-G ifadesinin tümör hücrelerini NK hücre lizizinden koruduğu ve böylece onlara güçlü bir immün kaçış mekanizması sağladığı belirtilmektedir (146). Araştırmacılar, HLA-G'nin bütüncül kaybını kanser türleri üzerinde iyi prognoz ile ilişkilendirmektedir. Bu durumun tümörleri NK'lara karşı daha duyarlı hale getirdiği ve bu nedenle daha iyi bir prognostik durum ile sonuçlandığı düşünülmektedir. HLA-G gibi bazı klasik olmayan HLA Sınıf I antijenlerinin ifade düşüklüğü veya yokluğu, KIR-aracılı baskılayıcı sinyali yok ederek NK sitolitik efektör işlevinin aktivasyonuna sebep olduğu için HLA-G kaybının iyi prognoz üzerindeki etkisi, NK hücrelerinin yüzeyindeki HLA sınıf I allel-spesifik KIR varlığı ile açıklanmaktadır (4). Çalışmamızda, KRK'li hastaların dokuları üzerinde yapılan IHK çalışması sonucu, hücre yüzeyindeki HLA-G ifadesinde %16,7 gibi bir pozitiflik gözlemlenirken, KIR reseptörlerinde ise yüksek bir pozitiflik (%86,1) saptandı. Diğer bazı araştırmacılar da tümör dokusunda HLA-G'nin pozitif ifadesini gözlemlemişler ve böylece NK'ların baskılanması ile immün takipten kaçış gösterdiğini belirtmişlerdir (144, 145). Çalışmamızdaki bu oran çeşitli araştırmaların sonuçlarına kıyasla daha düşük gibi görünüyorsa da kontrol grubuna oranla kanserli dokularda pozitiflik gözlenmesi bakımından diğer araştırmacıların çalışmalarına benzer bir değer ortaya koymuştur.

Farklı kanser türlerinde HLA-G immünreaktivitesinin değişiklik gösterdiği görülmüştür. Uroseviç ve arkadaşları, HLA-G immünreaktivitesinin, akciğer kanserinde yüksek dereceli histolojiyle korele olduğunu bulmuşlardır (147). İleri evre over

kanserinde, metastaz yapmış olan hastalarda HLA-G ifadesinin anlamlılık ifade ettiği (103) ve endometrial adenokarsinomun ileri evrelerinde HLA-G proteinlerinin IHK çalışmalarında pozitif sonuç vererek anlamlı bir korelasyon oluşturduğu tespit edilmiştir (106). Farjadian ve arkadaşlarının mide ve kolorektal kanserli 100 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, IHK yöntemi uygulanan malign dokuların %41'inde pozitif sonuç gözlenmiştir. Bu HLA-G ifadesi kolorektal kanserli hastaların %43'ünde ve mide kanserine sahip hastaların ise %34,6'sında görülmüştür (148). Wang ve ark.'ları ise, HLA-G ifadesi ile glioma tümör boyutu arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmiştir (149). Başka bir çalışmada, kolorektal kanserli hastalarda HLA-E veya HLA-G ifadesini değerlendiren araştırmacılar, HLA-G veya HLA-E ile metastaz oranı ve mortalite arasında doğrudan bir ilişki olduğu sonucuna varmışlardır (92). Malign lezyonlarda HLA-G'nin atipik ifadesi, araştırmacılar tarafından tümör hücrelerinde meydana gelen epigenetik değişiklikler ile açıklanmaktadır (150). Bu çalışmalar, yalnızca kanser türleri arasında değil aynı zamanda kanserin evre ve derecesine bağlı olarak da HLA-G ifadesinin artış gösterebileceği hipotezini desteklemektedir. Tüm bu sonuçlara karşın, biz çalışmamızda kanserin evresi ile HLA-G ifadesi arasındaki anlamlılığa baktığımızda, evresi veya derecesi artan ileri evre kolorektal kanserli hasta dokularında HLA-G ifadesinin de buna bağlı olarak artış göstermediğini gözlemledik. Sonuçlarımız, HLA-G'nin başlangıç ve ileri evre KKK hastaları bakımından hiçbir değişiklik göstermediğini ortaya koymaktadır.

HLA-G ifadesi ile çalışılan klinikopatolojik faktörlerin hiçbiri arasında bir ilişki bulamadık. Fakat gastrik kanser (95, 149-151), özefageal skuamöz hücreli karsinom (152), hepatosellüler karsinom (153) ve akciğer kanseri (154) gibi farklı tümör çeşitleri üzerinde yapılan birtakım çalışmalar, HLA-G ifadesi ile tümör evresi ve/veya tümör derecesi arasında bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular HLA-G'nin tümör gelişimindeki rolünü yansıtabilir. Bizim sonuçlarımız ile önceki çalışmaların sonuçları arasındaki tutarsızlık, hastaların ameliyat öncesi aldığı farklı tedavi ve terapiler ile çalışılan hasta sayıları arasındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir.

HLA-G'nin aşırı ifadesi sadece tümör biyopsilerinde değil, aynı zamanda farklı malignitelere sahip hastalardan elde edilen biyolojik sıvılarda da tespit edilmiştir (155). sHLA-G periferik kan seviyelerinin, çeşitli kanser türlerini içeren bir takım patolojik durumlarda arttığı ve bu koşulların bazılarında, sHLA-G'nin hastalığın klinik seyri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (156). Kolorektal kanserde yüksek sHLA-G seviyelerinin,

NK ve CTL'lerin işlevlerini baskılayarak konakçının immün baskılanmasını güçlendirdiği ve böylece tümör hücrelerinin hayatta kalmasını desteklediği düşünülmektedir (157). Bilimsel kanıtlar sHLA-G'nin, iyi huylu ve benign over, meme ve kolorektal kansere karşı da malign ayrımında klinik değeri olan bir taşıyıcı tümör belirteci olabileceğini öne sürmektedir (109, 158). Daha ileri deneysel veriler sHLA-G'nin renal, kolorektal, gastrik, özofagus ve akciğer kanserinde yararlı bir ameliyat öncesi tanı biyobelirteci olabileceğini ifade etmiştir (159). Meme, yumurtalık ve kolorektal karsinomun yanı sıra melanom, nöroblastom ve lenfoproliferatif maligniteler de dahil olmak üzere çeşitli malign tümörlü hastada, sağlıklı kontrollere veya iyi huylu neoplazmlı hastalara kıyasla yüksek çıkan sHLA-G düzeyleri güçlü ve bağımsız bir prognostik faktör olarak ortaya çıkmaktadır (160). Klinik çalışmalar, malign melanom, glioma, göğüs ve yumurtalık kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC), kronik lenfositik lösemi ve B ve T hücre non-Hodgkin lenfoma olan hastaların serumlarında sHLA-G seviyelerinin anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir (161, 162).

Çalışmamızda, hasta ve kontrollerin periferik kanlarından elde edilen serumlarından ölçümlendiğimiz sHLA-G oranlarında bir anlamlılık tespit edilmemiştir. Fakat çeşitli kanser türleri üzerinde yapılan bazı çalışmalar, kontrol grubuna oranla hasta grubunda yüksek sHLA-G anlamlılığının saptandığı göstermiştir. Çok az sayıda çalışma, invaziv meme kanserinde dolaşımdaki HLA-G ifadesinin olası klinik etkilerini araştırmış, meme kanseri hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla belirgin şekilde daha yüksek sHLA-G seviyeleri tespit etmiştir (112, 163). Provatopoulou ve arkadaşları da, bulgularında plazma sHLA-G seviyelerinin meme kanserli hastalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (164). Araştırmacılar malign ve benign prostat kanserli hastalar ile sağlıklı kontrollerden oluşan 26'şar kişilik 3 grup üzerinde yaptıkları çalışmada, en yüksek sHLA-G seviyesini malign grupta ve en düşük sHLA-G seviyesini ise kontrol grubunda gözlemlemişler ve kanserin derecesi ile serumdaki HLA-G seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Benzer şekilde Jeong ve arkadaşları da, göğüs kanseri hastaları üzerinde yaptıkları çalışmalarında, sHLA-G seviyesinin kontrol grubuna oranla hasta grubunda önemli ölçüde yüksek çıktığını saptamışlardır (165). Araştırma sonuçları, kanserin erken teşhisi morbidite ve mortaliteyi azaltabileceğinden, çeşitli ülkelerden bilim insanlarını HLA-G'nin serum seviyesinin değerlendirilmesinin, kanserin taranması,

teşhisi ve evrenmesinde yeni ve kolay bir yöntem olarak kullanılabilceği düşüncesine sevk etmiştir. İmmüitenin kendi içerisinde meydana gelebilecek değışikliklerin önemli bir sinyali olan sHLA-G'nin, agresif tümörlere tanı koymada kullanılabilcek potansiyel yeni bir belirteç olarak kabul edilebileceği düşünölmektedir. Zhu ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada bu düşüneyi destekleyecek şekilde kolorektal kanserli hastaların serumlarında benign tümörlere sahip hastaların serumlarındakinden daha yüksek seviyelerde sHLA-G saptamaları sebebiyle sHLA-G'nin malign tümörleri benign tümörlerden ayırmada yeni bir invazif olmayan yaklaşım sağlayabileceğini belirtmişlerdir (158). Bu sonuçlar karşısında araştırmacıların sHLA-G'nin aşırı ifadesinin ve erken evre tümör hücreleri tarafından kana salınmasının immün baskılanmaya sebep olduğunu ve bunun da tümörün ilerlemesini kolaylaştırdığını düşünmelerine rağmen biz çalışmamızda sHLA-G seviyesinde hasta ve kontrol grubu arasında herhangi bir farklılık gözlemedik. Bu durum Türk popölasyonundaki bireylerin serum HLA-G değerlerinin dünya popölasyonlarından farklı olması ile açıklanabileceği ihtimalini doğurması yanında bu bağlamda diğer literatür çalışmalarına paralel sonuç elde edemediğimizden dolayı tümörün prognozu ve sHLA-G arasında herhangi bir ilişki kuramamaktayız.

Çalışmamızda, KRK'li hasta serumlarındaki sHLA-G konsantrasyonu ile tümör dokularında HLA-G ifadesi arasında bir korelasyon bulunamadı. Bu noktada bulgularımız, Lin ve arkadaşlarının hepatosellüler karsinomlu hastalar üzerinde yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla tutarlıdır (153). Farklı birkaç kanser çeşidi üzerinde yapılan diğer çalışmalarda da benzer şekilde, dokuda tespit edilen HLA-G seviyeleri ile aynı hastaların kanlarındaki sHLA-G seviyeleri arasında korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir (166, 99).

Bir diğer çalışmada, plazma/serum sHLA-G seviyelerinin sağlıklı deneklere kıyasla kanser ve viral enfeksiyonlu hastalarda daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (160). Konuya farklı bir yaklaşımda bulunan araştırmacılar bunun sebebinin, serbest dolaşan sHLA-G'nin ya tümör hücreleri veya virüsle enfekte olmuş hücreler ya da aktive edilmiş monositler ve dendritik hücreler gibi diğer hücre popölasyonları tarafından doğrudan salınması olduğunu düşünmüşlerdir. Bu gözlem, sHLA-G'nin aktive edilmiş immün hücreler tarafından salgılandığını ve tümör hücrelerine veya virüsle enfekte hücrelere karşı süregelen bir immün tepkisi olduğunu düşündürmektedir. Kirana ve arkadaşları da bu görüşü doğrularak, muhtemelen hem tümör hücreleri hem

de periferik kan monositleri tarafından salgılanmasından dolayı sHLA-G'nin KRK patofizyolojisinde karmaşık bir görevi olduğunu ifade etmektedirler (167). Bu bulgulara göre, kanser hastalarındaki sHLA-G seviyeleri sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek seviyelerde olmasına rağmen, dolaşımdaki sHLA-G varlığının kanser hastalarıyla sınırlı olmadığı ve tümör hücrelerindeki HLA-G ifadesi ile doğrudan bağlı veya ilişkili olmadığı düşünülmektedir (99).

Provatopoulou ve ekibi, çalışmalarında sHLA-G seviyesi ile hastaların yaşı veya hastalığın derecesi arasında bir korelasyon gözlemlemediklerini belirttiler (164). Çeşitli klinik çalışmalar, servikal kanser (168), özofagus skuamöz hücreli karsinom (169) ve melanom hastalarında (157) plazma veya serumdaki sHLA-G konsantrasyonu ile genel sağkalım ve hastaliksız sağkalım dahil olmak üzere klinik parametreler arasında bir ilişki bulamamıştır. Benzer şekilde, Ugurel ve ekibi de melanom hastalarındaki serum sHLA-G seviyelerinin, hastaların genel sağkalımını ve kanserin ilerleyişini etkilemediğini gözlemlemişlerdir (146). Biz de çalışmamızda diğer araştırmacıların sonuçlarına benzer şekilde, hastaların yaşı, kanserin derecesi, lenf nodu sayısı ve tümör derinliği arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlemedik. Bu konuda kolorektal kanserli hastalardan ziyade diğer kanser çeşitleri üzerinde yapılan daha fazla sayıda çalışma mevcut olması nedeniyle çeşitli kanser türlerinde sHLA-G'nin durumu üzerine örnek vermenin ve verileri karşılaştırmanın daha uygun olacağını düşündük. Bu bağlamda dolaşımdaki sHLA-G seviyesinin kontrollere oranla hastalarda daha yüksek oranda gözlemlendiği çalışmalar mevcut olsa da sHLA-G seviyelerinin hastalığın derecesi, yaş, cinsiyet gibi klinikopatolojik parametreler ile ilişkili olmadığını gözlemlediğimiz sonuçlarımızın paralel olduğu çalışmalar çoğunluktadır. Ayrıca tümörün derinliği ve lenf nodu sayısı ile sHLA-G arasında da herhangi bir anlamlılık tespit edilmemiştir.

Hücre yüzeyinde ifade edilen HLA-G'nin yanında, kanda serbest olarak dolaşan sHLA-G moleküllerinin hasta ve kontrol sınırlarındaki seviyeleri ve kanserin histopatolojik özellikleri ile hasta yaşı ve cinsiyeti ile olan ilişkisi hakkındaki tartışmalar devam etse de araştırmacıların çoğu hasta sınırlarında sHLA-G moleküllerinin artış gösterdiği kanaatindedir. Biz çalışmamızda hasta ve kontrol serumları arasında anlamlılık ifade eden bir farklılık gözlemlemedik ancak farklı kanser çeşitleri üzerinde ve değişik yaş grupları arasında yapılacak olan daha geniş çaplı bir

araştırmanın, konunun aydınlanması adına önemli bir literatür kaynağı olacağı kanaatindeyiz.

HLA-G'nin ve buna bağlı olarak da sHLA-G'nin, immünglobulin-benzeri transkriptlere (ILT) ve KIR gibi baskılayıcı reseptörlere bağlanarak, fonksiyonlarını esas olarak NK'lara, T lenfositlerine ve antijen-sunan hücelere karşı kullandıkları saptanmıştır (81). Buradan malign kanserli hastaların doku ve serumlarındaki HLA-G ve sHLA-G seviyelerinin, NK hücre reseptörlerinden HLA-G'nin eşleniği olan KIR (2DL4/p49) ile etkileşimine bağlı olarak bireylerin immün toleran fonksiyonları üzerindeki rollerinin önemi anlaşılmaktadır. HLA-G'nin KIR'lar ile etkileşimi aracılığı ile NK hücre sitotoksitesinin baskılanmasında direkt bir rolü olduğu ortaya atılmıştır (11). Ayrıca, sHLA-G'nin NK hücre apoptozuna sebep olabildiği düşünülmektedir (165).

NK'lar, vücudun doğal immün yanıtında kritik işlevleri yerine getirmektedirler. Aynı zamanda hem viral enfeksiyonu ortadan kaldırırken, hem de henüz başlangıç evresinde olan kanserleri yok ederler (170, 171). NK hücreleri tarafından ifade edilen reseptörler ve özellikle KIR'lar NK hücre aktivitesini düzenleyebilirler (172). KIR/HLA bileşiminin lösemi, servikal neoplazi, melanom ve Epstein Barr virüsü (EBV) ile ilişkili nazofarenks karsinomuna (NPC) duyarlılıkla ilişkili olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (173, 174). KIR'lar ise NK'lar tarafından ifade edilmekte ve HLA-G'ye özel bir reseptör sunmaktadırlar. HLA-G'lerin ise bu reseptörler aracılığıyla endotel hücreler gibi profesyonel ASH, T hücreleri ve NK hücreleri ile direkt etkileşime girerek onları baskıladığı düşünülmektedir. Konuya ilişkin olarak Alkhouly ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, kemoterapiden önce ve sonra hasta dokularındaki HLA-G ve serumlardaki NK hücre seviyelerini ölçümlemek istemişler ve terapiden önce hücre membranlarındaki HLA-G ifade seviyelerinin çok yüksek olduğunu ancak buna rağmen terapiden sonra bu oranın büyük ölçüde düşüş gösterdiğini gözlemlemişlerdir (175). Ayrıca yine terapiden önce hasta serumlarındaki NK hücre seviyesi oldukça yüksekken, terapiden sonra ciddi oranda azalış göstermiştir.

Meme kanseri hastaları üzerinde yapılan araştırmalar, KIR2DL2 reseptörlerinin, sağlıklı kontrollere oranla hasta bireylerde daha yüksek seviyelerde ifade edildiğini göstermektedir. Biz de çalışmamızda, KRK'li hastaların tümör dokularındaki KIR2DL4 baskılayıcı reseptörlerinin ifadesindeki değişimleri inceledik ve tümörlü hastalarda, sağlıklı kontrollere oranla %86,1 pozitiflik saptadık. Bunun yanında, KIR ifadesi ile

çeşitli klinik patolojik parametreler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde, yaş faktörünün KIR ifadesi ile anlamlılık ifade ettiğini gözlemledik. Bu sonuca göre, yaş arttıkça hücrelerdeki KIR ifadesinin de artış gösterdiği gözlenmiştir. Fakat hastaların yaşları ile kanser evresi arasında bir anlamlılık tespit edilmemiştir. Hasta grubunda gözlemlediğimiz yüksek KIR pozitifliği sonucumuz, diğer araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Buna rağmen, çalışmamızın göreceli olarak az sayıda hastanın değerlendirilmesi ile sınırlı olduğunu belirtmek isteriz.

Yapılan çalışmalar sonucunda KIR ve HLA antijenleri arasındaki etkileşimin, kanser tedavisinde kullanılabilecek oldukça önemli bir belirteç ve prognostik faktör olabileceğine dair düşünceler gün geçtikçe artmaktadır. KIR blokajı, kanser hastalarında NK hücre aracılı sitotoksikite yanıtlarını arttırmak için terapötik anlamda uygun bir seçenek olabilir (176). Baskılayıcı KIR'lar NK hücre aktivasyonunu düzenleyebildiklerinden dolayı, KIR'ları baskılayan terapötik stratejilerin geliştirilmesi NK hücrelerinin aktivitesini arttıracığından kanserle savaşılmasında önemli ve değerli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Konuya ilişkin biz de çalışmamızda uygun terapötik tedavi seçeneklerine katkıda bulunabileceği düşüncesiyle, hasta grubumuzda T (tümör derinliği) ve N (lenf nodu sayısı) değerleri ile KIR ifadesi arasındaki ilişkiye baktığımızda, aralarında herhangi bir anlamlılık gözlemedik. Konuya ışık tutabilecek daha geniş çaplı çalışmaların ülkemiz literatürüne gelecekteki tanı, teşhis ve tedavi süreçlerinde yardımcı olabilecek daha fazla veri sunabileceği kanaatindeyiz. Bu nedenle kolorektal kanserde NK hücrelerini, dolayısıyla da immüniteyi etkileyen KIR/HLA etkileşimlerinin mekanizmalarını analiz etmek için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, HLA-G'nin kolorektal karsinomların çoğunda ifade edildiğini gösteren birçok çalışmaya paralel bir şekilde, biz de çalışmamızda sağlıklı kontrollere oranla KRK'li hastaların dokularında HLA-G artışı gözlemledik. Tüm bu sonuçlar, primer tümörlerde IHK boyamaları ile tespit edilen HLA-G ifadesinin, insan kolorektal kanserinde güçlü ve bağımsız bir prognostik değere sahip olduğu ve dolayısıyla HLA-G proteininin faydalı bir prognostik belirteç olabileceğini göstermektedir. HLA-G proteini, yalnızca bireysel tümörlerin farklı biyolojilerini değil aynı zamanda çalışma popülasyonlarındaki farklılıkları da yansıtan çok heterojen bir biyobelirteçtir (177). Bunun yanında, dünya literatüründe konuya ilişkin yapılan araştırmalar, sağlıklı

bireylerin serum veya plazma örneklerine kıyasla, kanserli hasta serumlarındaki sHLA-G seviyelerinin ciddi ölçüde yüksek pozitif sonuç verdiğini belirtmektedir. Fakat biz çalışmamızda, KRK'li hasta ve sağlıklı kontrol serumları arasında anlamlı bir farklılık veya sonuç gözlemedik. Sonuçlardaki bu farklılık, farklı popülasyonlardaki gen havuzu değişimleri, IHK çalışmaları esnasında meydana gelen herhangi bir komplikasyon, hasta sayısının yetersizliği veya bir takım klinik patolojik parametrelere bağlı olabileceği ihtimallerini akla getirmektedir. Ayrıca sağlıklı dokularda veya benign tümörlerde KIR ifadesinin artış gösterdiği sonucuna paralel şekilde, sağlıklı ve KRK'li bireylerin dokularında yapmış olduğumuz IHK boyamaları ile, tümörlü dokularda yüksek bir KIR ifade pozitifliği gözlemedik. Bu konuda dünyada ve ülkemizde yapılacak olan uzun süreli takip süresine sahip daha ileri ve geniş kapsamlı araştırmaların, HLA-G ve KIR ifadesinin tümör kaçış mekanizmalarında oynadığı rolle ilgili daha fazla bilgi sağlayacağını; sHLA-G ve HLA-G'nin immünite ile olan ilişkisinin kanser üzerindeki etkilerinin, hastaların teşhis ve tedavi sürecinde gelecekteki klinik ve immün terapötik yaklaşımlar açısından umut vaad edici sonuçlar ortaya koyarak, konuya ilişkin soru işaretlerini ortadan kaldıracığını ve daha net sonuçlar ortaya koyacağını düşünmekteyiz.



## KAYNAKLAR

1. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet*. 2005;**365**:153–65.
2. Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis O, Scholefield JH, et al. İmmüno-surveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*. 2006;**118**:6–10.
3. Glynn, L.E. (1988) Natural history of the major histocompatibility complex. *Cell Biochem. Funct.* **6**, 222.
4. Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, Ellis IO, Durrant LG. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2005;**117**:248–55.
5. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends İmmünol* 2003;**24**:603–609.
6. Hammerling, G. J., Klar, D., Pulm, W., Momburg, F., and Moldenhauer, G. The influence of major histocompatibility complex class I antigens on tumor growth and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987;**907**: 245-259.
7. Torigoe T, Asanuma H, Nakazawa E, Tamura Y, Hirohashi Y, Yamamoto E, Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: unusually high frequency of down-regulation in breast cancer tissues. *Pathol Int*. 2012;**62**:303–8.
8. Halvorsen and Seim, Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 1989;**42** (2):162–166.).
9. LeMaoult J, Krawice-Radanne I, Dausset J, Carosella ED. HLA-G1-expressing antigen-presenting cells induce immuno-suppressive CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;**101**:7064–7069.
10. Colonna M, Navarro F, Bellon T, Llano M, Garcia P, et al. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1997;**186**: 1809–1818.

11. Soderstrom K, Corliss B, Lanier LL, Phillips JH. CD94/NKG2 is the predominant inhibitory receptor involved in recognition of HLA-G by decidual and peripheral blood NK cells. *J İmmünol.* 1997;**159**:1072–5.
12. Klug, S.W., Cummings, R.M., Spencer A.C. (2011) “Bölüm 18” *Genetik Kavramlar*. Çev., Cihan Öner, Sibel Sümer, Reyhan Öner, Ay Öğüş, Leyla Açık. Ankara: Palme Yayıncılık.
13. American Cancer Society. (2017) *Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019*. Atlanta: American Cancer Society. Erişim 12.07.2017  
<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2017-2019.pdf>
14. Roche Türkiye. (2015) *Kolorektal Kanser*. Erişim 12.07.2017  
<http://www.rocheilac.com.tr/home/faaliyet-alanlari/onkoloji---hematoloji/solid-kanserler/kolorektal-kanser.html>
15. Gülmezoğlu E. ve Ergüven S. (1994) *İmmünoloji*. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık.
16. Abbas, K.A, Lichtman, H.A. (2007) *Temel İmmünoloji*. Çev., Yıldız Camcıoğlu, Günnur Deniz. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
17. National Institutes of Health National Institute of Allergy and Infectious Disease. *What is the Immüne System?* Erişim 28.07.2017  
[https://www.vaccines.gov/basics/prevention/immune\\_system/index.html](https://www.vaccines.gov/basics/prevention/immune_system/index.html)
18. Abbas K.A., Lichtman H.A. (2007) “Bölüm 2” *Temel İmmünoloji*. Çev., Yıldız Camcıoğlu, Günnur Deniz. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
19. Purdy AK, Campbell KS. Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR). *Cancer biology & therapy.* 2009;**8(23)**:13-22.
20. Kochan G, Escors D, Breckpot K, Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology.* 2013;**2(11)**:e26491. doi:10.4161/onci.26491.
21. Live Science. (2018) *İmmüne System: Diseases, Disorders & Function*. Erişim 04.08.2018 <https://www.livescience.com/26579-immune-system.html>

22. Bağışıklık. *Bağışıklık ve Bağışıklık Sistemi*. Erişim 05.08.2017  
<http://bagisiklik.com/bagisiklik/bagisiklik-ve-bagisiklik-sistemi/>
23. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2012) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. Innate İmmünyte. Erişim 05.08.2017  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>
24. The College of Physicians of Philadelphia. *The Human İmmünyte System and Infectious Disease*. Erişim 05.08.2017  
<https://www.historyofvaccines.org/content/articles/human-immune-system-and-infectious-disease>
25. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. (2001) *İmmunobiology: The İmmünyte System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland Science. Principles of innate and adaptive immunity. Erişim 06.08.2017  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>
26. Bağışıklık. *Edinsel Bağışıklık*. Erişim 08.08.2017  
<http://bagisiklik.com/bagisiklik/bagisiklik-ve-bagisiklik-sistemi/>
27. Abbas K.A., Lichtman H.A. (2007) “Bölüm 1” *Temel İmmunoloji*. Çev., Yıldız Camcıoğlu, Günnur Deniz. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
28. Danilova N. The evolution of adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* (2012) **738**:218–35. doi:10.1007/978-1-4614-1680-7\_13
29. Bonilla, F.A.; Oettgen, H.C. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. İmmünol.* 2010, **125**, S33–S40.
30. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science. Chapter 24, The Adaptive İmmünyte System.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21070/>
31. Helmenstine, A.M. (2017, Mart) *An Introduction to Active İmmünyte and Passive İmmünyte*. Science, Tech, Math: Science Erişim 08.08.2017  
<https://www.thoughtco.com/active-immunity-and-passive-immunity-4134137>
32. Özkuyumcu, C. *Bağışık Yanıtta Rol Oynayan Doku , Organ ve Hücreler*. Erişim 11.08.2017 [http://hacettepemikrobiyoloji.com/ogrenci/cumhur/ihucre\\_not.pdf](http://hacettepemikrobiyoloji.com/ogrenci/cumhur/ihucre_not.pdf)
33. Chaplin DD. *Overview of the immune response*. *J Allergy Clin İmmünol* (2010) **125**:S3–23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980

34. Bağışıklık ve Bağışıklık Sistemi. *Bağışıklık Sisteminin Hücre ve Organları*. Erişim 12.08.2017 <http://bagisiklik.com/bagisiklik/bagisiklik-ve-bagisiklik-sistemi/>
35. Maher, J, and E T Davies. “Targeting Cytotoxic T Lymphocytes for Cancer İmmünotherapy.” *British Journal of Cancer* 91.5 (2004): **817**–821. PMC. Web. 12 Aug. 2017.
36. Hadrup, Sine, Marco Donia, and Per thor Straten. “Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment.” *Cancer Microenvironment* 6.2 (2013): **123**–133. PMC. Web. 12 Aug. 2017.
37. Osińska, Iwona, Katarzyna Popko, and Urszula Demkow. “Perforin: An Important Player in İmmüne Response.” *Central-European Journal of İmmünology* 39.1 (2014): **109**–115. PMC. Web. 12 Aug. 2017.
38. E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. (2008) *Functions of natural killer cells*. *Nature İmmünology*, vol. 9, no. 5, pp. **503**–510.
39. Terunuma H, Deng X, Dewan Z, et al. Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections. *Int Rev İmmünol* 2008;**27**:93–110.
40. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death and Differentiation*. 2015;**22**(2):237-246. doi:10.1038/cdd.2014.134.
41. H. Arase, N. Arase, and T. Saito. (1996) *Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking*. *Journal of Experimental Medicine*, vol. 183, no. 5, pp. 2391–2396.
42. Flodstrom-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Hoglund P, Ljunggren HG. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin İmmunol*. 2009; **21**(6):634–640. Erişim 12.08.2017 PMID: 19892538
43. Raymaakers, K. (2017, Haziran) *Myeloid Cell Line*. *Leukemia&Lymphoma* Erişim 17.08.2017.
44. Dougan M, Dranoff G. (2009) *The immune response to tumors*. *Curr Protoc İmmünol.*; Chapter 20: Unit 20.11. doi: 10.1002/0471142735.im2011s85.

45. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; **276**: 1268-1272.
46. Kornstein MJ, Brooks JS, Elder DE. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host responses to melanoma and nevi. *Cancer Res* 1983; **43**: 2749-2753.
47. Von Kleist S, Berling J, Bohle W, Wittekind C. Immunohistochemical analysis of lymphocyte subpopulations infiltrating breast carcinomas and benign lesions. *Int J cancer* 1987; **40**: 18-23.
48. Whiteside TL. (1993) *Tumor infiltrating lymphocytes in human malignancies*. Austin, Tex: RG Landes Co.
49. Shalapour S, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J Clin Invest* 2015; **125**:3347–55.
50. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* (2013) **39**:1–10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
51. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. *B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients*. *Oncoimmunology*. 2013; 2:e25443.
52. Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol*2006; **24**:467–96.
53. Tsou P, Katayama H, Ostrin EJ, Hanash SM. The Emerging Role of B Cells in Tumor Immunity. *Cancer Res*. 2016; **76**:5597–601
54. Balkwill F, Montfort A, Capasso M. B regulatory cells in cancer. *Trends Immunol* 2013; **34**:169–73.
55. T.L. Whiteside, Apoptosis of immune cells in the tumor microenvironment and peripheral circulation of patients with cancer: implications for immunotherapy, *Vaccine* 20 (2002) A46eA51.
56. Smyth MF, Godfrey DI. NKT cells and tumor immunity: a double-edged sword. *Nat Immunol* 2000; **1**: 459-460.
57. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004; **5**:1260.

58. Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends in immunology*. 2005;**26**:668.
59. Whiteside TL, Vujanovic NL, Herberman RB. Natural killer cells and tumor therapy. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1998; **230**: 221-244.
60. Davis JE, Smyth MJ, Trapani JA. Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity. *European journal of immunology*. 2001;**31**:39.
61. Hayakawa Y, Kelly JM, Westwood J, Darcy PK, Diefenbach A, Raulet DH, Smyth MJ. Tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is strictly dependent on perforin. *J Immunol*. 2002;**169**:5377.
62. Vujanovic NL, Nagashima S, Herberman RB, Whiteside TL. Non- secretory apoptotic killing by natural killer cells. *J Immunol* 1996; 157: 1117-1126. & Yokoyama WM. Natural killer cell receptors. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 298-305.
63. Deguine J, Breart B, Lemaitre F, Di Santo JP, Bousso P. Intravital Imaging Reveals Distinct Dynamics for Natural Killer and CD8(+) T Cells during Tumor Regression. *Immunity*. 2010;**33**:632.
64. Marcus A, Gowen BG, Thompson TW, Iannello A, Ardolino M, Deng W, Wang L, Shifrin N, Raulet DH. Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol* 2014;**122**:91-128.
65. Shih JY, Yuan A. Tumor-associated macrophage: Its role in cancer invasion and metastasis. *J Cancer Mol*. 2006;**2**:101–6.
66. Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, Takeya M (2011) Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci* **102**(7): 1424–1431.
67. Campbell MJ, Tonlaar NY, Garwood ER, Huo D, Moore DH, Khramtsov AI, Au A, Baehner F, Chen Y, Malaka DO, Lin A, Adeyanju OO, Li S, Gong C, McGrath M, Olopade OI, Esserman LJ (2011) Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat* **128**(3): 703–711.

68. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR (2012) Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol* **65**(2): 159–163.
69. Scott KA, Arnott CH, Robinson SC, Moore RJ, Thompson RG, Marshall JF, et al. TNF- $\alpha$  regulates epithelial expression of MMP-9 and integrin  $\alpha$ - $\beta$ 6 during tumour promotion. A role for TNF- $\alpha$  in keratinocyte migration? *Oncogene*. 2004;**23**:6954–66.
70. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; **56**: 4625-4629.
71. Shiina, T.; Inoko, H.; Kulski, J. K. An Update of the HLA Genomic Region, Locus Information and Disease Associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; **64**, 631–649.
72. Marsh S, Albert E, Bodmer W, Bontrop R, Dupont B, Erlich H, et al. Nomenclature for factors of the HLA System, 2004. *Hum Immunol* 2005;**66**:571–636.
73. Chang CC, Ferrone S. Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;**56**:227–36.
74. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;**121**:1–14.
75. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett*. 2005;**100**:7–13.
76. Chang CC, Campoli M, Ferrone S. Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions. *Adv Cancer Res*. 2005;**93**:189–234.
77. Dunker K, Schlaf G, Bukur J, Altermann WW, Handke D, Seliger B. Expression and regulation of non-classical HLA-G in renal cell carcinoma. *Tissue antigens*. 2008; **72**:137-148.
78. Wischhusen J, Waschbisch A, Wiendl H. Immune-refractory cancers and their little helpers-an extended role for immunotolerogenic MHC molecules HLA-G and HLA-E? *Semin Cancer Biol*. 2007;**17**:459–468.

79. Lazzaro B, Anderson AE, Kajdacsy-Balla A, and Hessner MJ (2001). Antigenic characterization of medullary carcinoma of the breast: HLA-DR expression in lymph node positive cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **9**, 234–241.
80. Dengjel J, Nastke MD, Gouttefangeas C, Gitsioudis G, Schoor O, Altenberend F, Muller M, Kramer B, Missiou A, Sauter M, et al. (2006). Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res* **12**, 4163–4170
81. Taramelli D, Fossati G, Mazzocchi A, Delia D, Ferrone S, and Parmiani G (1986). Classes I and II HLA and melanoma-associated antigen expression and modulation on melanoma cells isolated from primary and metastatic lesions. *Cancer Res* **46**, 433–439.
82. Tripathi P, Agrawal S: Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest* 2006, **24**:178e186.
83. Bruttel VS, Wischhusen J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front Immunol.* 2014;**5**:360.
84. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol.* 2013;**14**:1014–22.
85. Curigliano G, Criscitiello C, Gelao L, Goldhirsch A. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G) *Clin Cancer Res.* 2013;**19**:5564–71.
86. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990;**248**:220–3.
87. Cirulli V, et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes.* 2006;**55**:1214–22.
88. Paul P, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;**95**:4510–5.
89. Yan WH. Human leukocyte antigen-G in cancer: are they clinically relevant. *Cancer Lett.* 2011;**311**:123–30.
90. Riteau B, et al. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum Immunol.* 2003;**64**:1064–72.



91. Ramos CS, et al. Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. *Hum Immunol*. 2014;**75**:667–672.
92. Guo ZY, Lv YG, Wang L, Shi SJ, Yang F, Zheng GX, Wen WH, Yang AG. Predictive value of HLA-G and HLA-E in the prognosis of colorectal cancer patients. *Cell Immunol* 2015;**293**:10-6.
93. Miranda LN, et al. Greater expression of the human leukocyte antigen-G (HLA-G) and interleukin-17 (IL-17) in cervical intraepithelial neoplasia: analytical cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. 2015;**133**:336–42.
94. Bijen CB, et al. The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2010;**126**:1417–27.
95. Tuncel T, Karagoz B, Haholu A, et al (2013). Immunoregulatory function of HLA-G in gastric cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**, 7681-4.
96. Wastowski IJ, et al. Human leukocyte antigen-G is frequently expressed in glioblastoma and may be induced in vitro by combined 5-aza-2'-deoxycytidine and interferon- $\gamma$  treatments: results from a multicentric study. *Am J Pathol*. 2013;**182**:540–52.
97. Wang Y, Ye Z, Meng XQ, Zheng SS. Expression of HLA-G in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2011;**10**:158–63.
98. Yan WH, Liu D, Lu HY, Li YY, Zhang X, Lin A. Significance of tumour cell HLA-G5/-G6 isoform expression in discrimination for adenocarcinoma from squamous cell carcinoma in lung cancer patients. *J Cell Mol Med*. 2015;**19**:778–85.
99. Rutten MJ, et al. HLA-G expression is an independent predictor for improved survival in high grade ovarian carcinomas. *J Immunol Res*. 2014;**2014**:274584.
100. Xu YF, et al. High expression of human leukocyte antigen-G is associated with a poor prognosis in patients with PDAC. *Curr Mol Med*. 2015;**15**:360–7.
101. de Figueiredo Feitosa NL, et al. HLA-G is differentially expressed in thyroid tissues. *Thyroid*. 2014;**24**:585–92.
102. Yie SM, Yang H, Ye SR, Li K, Dong DD and Lin XM: Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* **14**: 2721-2729, 2007.

103. Davidson B, Elstrand MB, McMaster MT, et al. HLA-G expression in effusions is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005;**96**:42–47.
104. Singer G, Kurman RJ, McMaster MT, et al. HLA-G immunoreactivity is specific for intermediate trophoblast in gestational trophoblastic disease and can serve as a useful marker in differential diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2002;**26**:914–920.
105. Ibrahim EC, Aractingi S, Allory Y, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer* 2004;**108**:243–250.
106. Barrier BF, Kendall BS, Sharpe-Timms K, et al. Characterization of human leukocyte antigen-G (HLA-G) expression in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2006;**103**:25–30.
107. Hansel DE, Rahmanb A, Wilentz RE, et al. HLA-G upregulation in pre-malignant and malignant lesions of the gastrointestinal tract. *Int J Gastrointest Cancer* 2005;**35**:15–24.
108. Ye SR, Yang H, Li K, Dong DD, Lin XM, Yie SM. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol.* (2007) **20**:375–83. doi: 10.1038/modpathol.3800751.
109. Singer G, Rebmann V, Chen YC, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:4460–4464.
110. Greer SE, Goodney PP, Sutton JE, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy for esophageal carcinoma: a meta-analysis. *Surgery.* 2005;**137**:172-177.
111. Shang-mian Yie, Hong Yang, Shang-rong Ye, Ke Li, Dan-dan Dong, Xin-mei Lin; Expression of HLA-G Is Associated With Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 128, Issue 6, 1 December 2007, Pages 1002–1009.
112. He X, Dong DD, Yie SM, Yang H, Cao M, Ye SR, et al. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. *Ann Surg Oncol.* (2010) **17**:1459–69. doi: 10.1245/s10434-009-0891-9

113. Parsons MS, Zipperlen K, Gallant M, Grant M. Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1 licenses CD16-mediated effector functions of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* 2010;**88**:905–912.
114. Rajagopalan S., Long E. O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* **189** 1093–1100.
115. Rajagopalan S, Long EO. KIR2DL4 (CD158d): an activation receptor for HLA-G. *Front Immunol.* (2012) **3**:258. doi: 10.3389/fimmu.2012.00258.
116. Benson DM Jr, Caligiuri MA. Killer immunoglobulin-like receptors and tumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2014;**2**(2):99-104.
117. Long E. O. (2008). Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol. Rev.* **224** 70–84.
118. Clements CS, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, et al. Structural studies on HLA-G: implications for ligand and receptor binding. *Hum Immunol* 2007;**68**:220–6.
119. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;**112**:461–469.
120. Moretta L, Locatelli F, Pende D, Sivori S, Falco M, Bottino C, et al. Human NK receptors: from the molecules to the therapy of high risk leukemias. *FEBS Lett.* 2011;**585**:1563–1567.
121. Luango de Matos et al. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomarker Insights* 2010;**5**.
122. WHO (2018). *Cancer Today*. WHO Situation Reports. Erişim 06.04.2019 [http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0&population\\_group\\_globocan\\_id=#collapse-group-0-3](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=#collapse-group-0-3)
123. Cancer.net (2005). *Colorectal Cancer: Statistics*. Erişim 30.04.2019 <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/statistics>.
124. Menier C, Rouas-Freiss N, Carosella ED (2009). The HLA-G non-classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in

- tumour escape from immune system and clinical applications. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, **6**, 879-900.
125. Özkan, Ö , Kaya, Ü , Güner, A , Cevizci, S , Özkul, F , Sezer, C , Reis, E . *Bir eğitim ve araştırma hastanesinde kolorektal kanser hastalarının demografik dağılımı ve hastalık özellikleri*. *Pamukkale Tıp Dergisi* (2012): 132-135.
126. American Cancer Society. (2011) *Cancer Facts & Figures 2011*. Atlanta: American Cancer Society. Erişim 30.04.2019  
<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2011.html>
127. Tatar M, Tatar F. Colorectal cancer in Turkey: current situation and challenges for the future. *Eur J Health Econ* 2010;**10**:99-105.
128. Özdemir Y, Sücüllü İ, Filiz Aİ, ve ark. Genç hastalarda kolorektal kanserlerin klinik ve patolojik özelliklerinin değerlendirilmesi. *Kolon Rektum Hast Der* 2009;**19**:169-171.
129. WHO. (2018) *Estimated Number of New Cases in 2018*. Erişim 04.04.2019  
[http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode\\_population=regions&population=250&population\\_s=250&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=1&include\\_nmsc\\_other=1&dual\\_distribution=2&population1=250&population2=554&show\\_values=false&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population\\_group\\_globocan\\_id=&type\\_sort=0](http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars-2?v=2018&mode=cancer&mode_population=regions&population=250&population_s=250&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&dual_distribution=2&population1=250&population2=554&show_values=false&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=&type_sort=0)
130. Gültekin M, Boztaş G, Utku EŞ, Ergün AK, Sevinç A, Tütüncü S, Dünder S, Seymen E. (2016) *Türkiye Kanser İstatistikleri*. Erişim 30.04.2019.  
[http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20\(v01.2\).pdf](http://www.onkoloji.gov.tr/attachments/article/8653/Ana%20Rapor%202016%20(v01.2).pdf)
131. Boyle P., Leon ME. Epidemiology of colorectal cancer. *British Medical Bulletin* 2002;**64**:1-25.
132. T.C.Sağlık Bakanlığı. (2014) *Türkiye Kanser İstatistikleri, 2014*. Erişim 04.04.2019. [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR.\\_uzuuun.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR._uzuuun.pdf)

133. TÜİK. (2015, 30 Mart) *Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2014*. Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855>
134. Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, et al. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 2004;**84**:493–501.
135. Zilberman S, Schenowitz C, Agaugue S, Benoit F, Riteau B, Rouzier R, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Menier C. HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: the influence of the tumor microenvironment. *Eur J İmmünol.* 2012;**42** (6):1599–1608.
136. Carosella ED, Moreau P, Lemaoult J, Rouas-Freiss N 2008 HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends İmmünol* **29**:125–132.
137. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J 2008 Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* **111**:4862–4870.
138. Yan WH 2010 HLA-G expression in hematologic malignancies. *Expert Rev Hematol* **3**:67–80.
139. Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. İmmüne system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest.* 2004;**84** (4):493–501.
140. Cavallo F, De GC, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer İmmünol İmmunother.* 2011;**60** (3):319–326.
141. Fons P et al (2006) Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood* **108**:2608–2615.
142. Yan WH, Fan LA (2005) Residues Met76 and Gln79 in HLA-G alpha1 domain involve in KIR2DL4 recognition. *Cell Res* **15**:176–182.
143. Agaugue S, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2 versus Th1/Th17. *Blood* (2011) **117**:7021–31. doi: 10.1182/blood-2010-07-294389.

144. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of 'tumor escape' phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;**3** (11:999–1005).
145. Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, Geraghty DE, Garrido F. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics*. 2003;**54** (11:767–775).
146. Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, et al. Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferonalpha immunotherapy. *Cancer* 2001;**92**:369–76
147. Urosevic M, Kurrer MO, Kamarashev J, et al. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade, human histology, leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 2001;**159**: 817–824.
148. Farjadian S, Tabebordbar M, Mokhtari M, Safaei A, Malekzadeh M, Ghaderi A. HLA-G Expression in Tumor Tissues and Soluble HLA-G Plasma Levels in Patients with Gastrointestinal Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;**19(10)**:2731–2735.
149. Wang Y, Fan X, Li H, Lin Z, Bao H, Li S, Wang L, Jiang T, Fan Y, Jiang T. Tumor border sharpness correlates with HLA-G expression in low-grade gliomas. *J Neuroimmunol* 2015;**282**:1-6.
150. Mouillot G, Marcou C, Rousseau P, et al (2005). HLA-G gene activation in tumor cells involves cis-acting epigenetic changes. *Int J Cancer*, **113**, 928-36.
151. Yie S-M, Yang H, Ye S-R, et al (2007a). Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol*, **14**, 2721-9.
152. Yie S-M, Yang H, Ye S-R, et al (2007b). Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*, **128**, 1002-9.
153. Lin A, Chen HX, Zhu CC, et al (2010). Aberrant human leukocyte antigen-G expression and its clinical relevance in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*, **14**, 2162-71.
154. Yie S-M, Yang H, Ye S-R, et al (2007c). Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, **58**, 267-74.

155. Cao M, Yie SM, Liu J, et al (2011). Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue Antigens*, **78**, 120-8.
156. Murdaca G, Contini P, Negrini S, et al. Immunoregulatory role of HLA-G in allergic diseases. *J Immunol Res* 2016;**2016**:6865758.
157. Rebmann V, Regel J, Stolke D, Grosse- Wilde H. Secretion of sHLA-G molecules in malignancies. *Semin Cancer Biol* 2003; **13**:371–7.
158. Zhu CB, Wang CX, Zhang X, Zhang J and Li W: Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. *Int J Cancer* **128**: 617-622, 2011.
159. Li BL, Lin A, Zhang XJ, Zhang X, Zhang JG, Wang Q, Zhou WJ, Chen HX, Wang TJ and Yan WH: Characterization of HLA-G expression in renal cell carcinoma. *Tissue Antigens* **74**: 213-221, 2009.
160. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S 2007 Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* **17**:469–479.
161. Schutt P, Schutt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, et al. (2010) Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen-G and total human leukocyte antigen class I molecules in lung cancer patients. *Hum Immunol* **71(5)**: 489–495.
162. Rebmann V, Nuckel H, Duhrsen U, Grosse-Wilde H (2007) HLA-G in Bchronic lymphocytic leukaemia: clinical relevance and functional implications. *Semin Cancer Biol* **17(6)**: 430–435.
163. Sayed D, Badr G, Maximous D, Mikhail NNH, Abu-Tarboush F and Alhazza IM: HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. *Tissue Ant* **75**: 40-47, 2010.
164. Provatopoulou X, Kalogera E, Sagkriotis A, Zagouri F, Nonni A, Zografos GC and Gounaris A: Soluble human leukocyte antigen-G expression in patients with ductal and lobular breast malignancy. *Anticancer Res* **32**: 1021-1026, 2012.
165. Jeong S, Park S, Park BW, et al (2014). Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. *PLoS One*, **9**, e98284.

166. Raffaghello L, Prigione I, Bocca P, et al. Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications. *Oncogene* 2005;**24**:4634–44.
167. Kirana, C., Ruskiewicz, A., Stubbs, R.S., Hardingham, J.E., Hewett, P.J., Maddern, G.J., & Hauben, E. (2017). Soluble HLA-G is a differential prognostic marker in sequential colorectal cancer disease stages. *International journal of cancer*, 140 11, 2577-2586 .
168. Samuels S, Ferns DM, Meijer D, et al. High levels of soluble MICA are significantly related to increased disease-free and disease-specific survival in patients with cervical adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 2015;**85**:476–83.
169. Lin A, Zhang X, Zhou WJ, et al. Human leukocyte antigen-G expression is associated with a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011;**129**:1382–90.
170. Martin MP, Borecki IB, Zhang Z, Nguyen L, Ma D, Gao X, Qi Y, Carrington M and Rader JS. HLA-Cw group 1 ligands for KIR increase susceptibility to invasive cervical cancer. *Immüngenetics*. 2010; **62(11-12)**:761-765.
171. Kim HJ, Choi HB, Jang JP, Baek IC, Choi EJ, Park M, Kim TG and Oh ST. HLA-Cw polymorphism and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene analysis in Korean colorectal cancer patients. *Int J Surg*. 2014; **12(8)**:815-820.
172. Urosevic M, Trojan A and Dummer R. HLA-G and its KIR ligands in cancer--another enigma yet to be solved? *J Pathol*. 2002; **196(3)**:252-253.
173. Portela P, Jobim LF, Salim PH, Koff WJ, Wilson TJ, Jobim MR, Schwartzmann G, Roesler R and Jobim M. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in prostate cancer and control group. *Int J Immüngenet*. 2012; **39(5)**:423-428.
174. Vineretsky KA, Karagas MR, Christensen BC, Kuriger- Laber JK, Perry AE, Storm CA and Nelson HH. Skin Cancer Risk Is Modified by KIR/HLA Interactions That Influence the Activation of Natural Killer Immüne Cells. *Cancer Res*. 2016; **76(2)**:370-376.
175. Alkhouly N, Shehata I, Ahmed MB, Shehata H, Hassan S, Ibrahim T. (2013) HLA-G expression in acute lymphoblastic leukemia: a significant prognostic tumor biomarker. *Med. Oncol*. **30**:460.



176. Ljunggren HG and Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. Nature [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) 82111 Oncotarget reviews Immunology. 2007; **7(5)**:329-339.
177. Urosevic M, Dummer R 2008 Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. Cancer Res **68**:627–630.



## GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın .....

Katılmış olduğunuz çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “**Kolorektal Kanselerde HLA-G’nin Doğal Öldürücü İnhibitör Reseptörler ile Etkileşiminin İncelenmesi**”dir.

Bu araştırmanın amacı, hastaların periferik kan lenfositlerinden izole edilen DNA ile sHLA-G antijenlerinin belirlenmesi ve hastaların doku grupları baz alınarak tümörlü dokuda bir yüzey belirteci olan HLA-G ve doğal immüntenin bir bileşeni olan NK hücrelerinin yüzeylerindeki KIR reseptörleri ifade kayıp ya da yokluğuna bakılmasıdır. Çalışmada tümör dokusu üzerinde sentezlenen HLA-G isimli antijenin, bir bağışıklık hücresi olan doğal öldürücü hücre (NK) yüzey belirteci üzerinde yaptığı olumsuz etkileri araştırılacaktır. Bu sayede kanserli ve sağlıklı olan kişilerdeki bazı yüzey reseptörlerinin karşılaştırması yapılarak gelecekteki teşhis ve tedavi süreçleri için umut vaad edici literatür bilgisi ortaya koyulacaktır.

Bu çalışmada Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi bölümünde kalın bağırsak ile ilgili ameliyat olan hastalardan ve kolonoskopi için gelmiş sağlıklı bireylerden doku ve kan örnekleri alınacaktır. Bu araştırma için Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na patolojinin uygun gördüğü doku örnekleri gönderilerek çalışma orada yapılacaktır. Ayrıca sizden ameliyat sonrası 5cc'lik kuru tüpe kan alınacaktır ve bu örnekler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'nda sHLA-G isimli belirtecin kandaki seviyesini belirlemek için testlenecektir. Alınan kan örnekleri ve dokular başka hiçbir amaç için kullanılmayacaktır. Yer aldığımız bu çalışmada öngörülen süre 2 yıl olup, çalışmada yer alacak gönüllülerin sayısı 90'dır.

Çalışmanın hasta adına istenmeyen etkileri ve riskleri bulunmamaktadır. Bu çalışmada size daha önce kullanılmamış hiçbir ilaç ya da teknik uygulanmayacaktır. Amacımız sizin gibi kolorektal cerrahi geçirmiş hastalarda HLA-G dokusunun bağışıklık hücresi NK üzerinde baskılayıcı bir rolü olup olmadığını tespit etmektir. Bu çalışmada sizin için ön kolunuzdan kan alımı esnasında az da olsa acı/ağrı, kan alımı sonrasında hafif bir kanama ve/veya morarma gibi riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir, ancak sizin için beklenen yarar sizin ve sizin gibi kolorektal kanseri olan

---

hastalar için bir tedavi seçeneği ve yaşam kalitesini en optimum şartlara taşımanın yollarını saptanmaya çalışmak olacaktır.

Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum tarafımızca size derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0-212-4142000- 32312 no.lu telefondan veya 0537 979 08 77 no.lu telefondan Bio. Ezgi Dinçer'e başvurabilirsiniz.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır, araştırmada yer aldığımız için size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, testler veya tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından desteklenmektedir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilir ya da araştırmacı tarafından çıkarılırsanız, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kişisel bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kişisel bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, araştırmaya dahil olan araştırmacılar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de arzu ettiğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

---

### ***Katılımcının/Hastanın Beyanı***

Sayın Dr.Kıvanç Derya Peker tarafından İstanbul Bakırköy Dr.Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr. Kıvanç Derya Peker 05325203659 no'lu telefon ve Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genel Cerrahi Kliniğinden arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

---

## GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

**Gönüllünün Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)**

**Araştırma ekibinde yer alan ve yetkin bir araştırmacının  
Adı-soyadı/ İmzası/ Tarih**

**Gerekirse olur işleme tanık olan kişinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)**

**Gerekirse yasal temsilcisinin Adı-soyadı/ İmzası/Tarih/ Adresi (varsa telefon no., faks no,...)**

---

## ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 291

Tarih : 13.03.2017

Konu Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ hk.

Sayın Prof. Dr. Fatma SAVRAN OĞUZ  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İlgi : Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalının 28/02/2017 gün ve 81542 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Ezgi DİNÇER' in yürüteceği 2016/1350 dosya numaralı "Kolonorektal Kanselerde HLA-G'nin Doğal Öldürücü Yüzey Belirteci KIR ile Etkileşiminin İncelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 25/11/2016 gün ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuştur.

İlgi değişiklik isteminiz, Değişiklik Bilgi Formu, çalışmanın ismi "Kolonorektal Kanselerde HLA-G'nin Doğal Öldürücü İnhibitör Reseptörler ile Etkileşiminin İncelenmesi" olarak değişmesi hakkında, kurulumuzun 10/03/2017 tarih ve 05 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### KOLOREKTAL KANSERLERDE HLA-G'NİN DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ İNHİBİTÖR RESEPTÖRLER İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

#### ORIJINALLIK RAPORU

% <b>13</b>	% <b>9</b>	% <b>1</b>	% <b>6</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Istanbul University</b> Öğrenci Ödevi	% <b>3</b>
<b>2</b>	<b>bagisiklik.com</b> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>3</b>	<b>mikrobiyoloji.info</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<b>www.alerjiklinigi.com</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<b>www.immuno-onkoloji.org</b> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<b>www.dent.ege.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>7</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>
<b>8</b>	<b>www.zhsmkansertarama.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Ezgi	<b>Soyadı</b>	DİNÇER
<b>Doğ.Yeri</b>	İSTANBUL	<b>Doğ.Tar.</b>	28.08.1992
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	42856921276
<b>Email</b>	ezbercem_92@hotmail.com	<b>Tel</b>	0537 979 08 77

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD	2019
<b>Lisans</b>	Kocaeli Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji	2014
<b>Lise</b>	Sabancı 50.Yıl Lisesi	2010

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
<b>1.</b>	Yönetici Asistanı	Omas Makina Otomasyon	2018-2019
<b>2.</b>	İngilizce Öğretmeni	Bulut Etüt Merkezi	2016-2017
<b>3.</b>			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	-	81 (YÖKDİL)

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>ALES Puanı</b>	69,82	70,8	66,09
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Word, Excell, Power point)	Çok iyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Okumak, araştırmak, dans etmek, müzik, resim yapmak.



