



**T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**AKCİĞER KANSERİ VE SİGARA İÇİMİ İLE *SOLUBLE HUMAN  
LEUCOCYTE ANTİGEN-G* SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Muhammet Engin ÖZCAN  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DÜZCE-2013**





T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERİ VE SİGARA İÇİMİ İLE *SOLUBLE HUMAN  
LEUCOCYTE ANTİGEN-G* SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Muhammet Engin ÖZCAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. RAMAZAN MEMİŞOĞULLARI

DÜZCE-2013

## ÖNSÖZ

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda hazırlamış olduğum tıpta uzmanlık tezinin tüm aşamalarında ve uzmanlık eğitimim süresince her türlü yardım ve desteğinden dolayı tez danışmanım Doç. Dr. Ramazan MEMİŞOĞULLARI'na uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Hilmi DEMİRİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardım ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Ali Nihat ANNAKKAYA'ya, Prof. Dr. Peri Meram ARBAK'a ve özellikle çalışmamın dizaynında ve yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Leyla YILMAZ AYDIN'a, uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Hayriye AK YILDIRIM'a, Dr. Nuri ORHAN'a, Dr. Taner UCGUN'a ve Dr. ÖZLEM ADMIŞ'a, tez çalışmam sırasında yardımları olan başta Kimya Müh. Behiye TUNA olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarımıza, tez vakalarının sistemik muayenelerinin yapılmasında yardımları olan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalında görevli tüm asistan doktor arkadaşlarıma, çalışmamızın istatistik analizlerini yapan Sayın Prof. Dr. Handan ANKARALI'ya ve desteklerinden dolayı Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne teşekkür ederim.

Son olarak tıpta uzmanlık eğitimim ve tez hazırlama dönemlerinde olduğu gibi tüm zamanlarda bana her türlü desteği ve sabrı gösteren sevgili eşime, aileme ve canım oğluma teşekkür ederim.

## TÜRKÇE ÖZET

### AKCİĞER KANSERİ VE SİGARA İÇİMİ İLE sHLA-G SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Akciğer kanseri 20. yüzyılın sonlarında itibaren önlenebilir ölümler arasında giderek artan bir orana sahip olmaya başlamıştır (1). Global olarak akciğer kanseri erkeklerde en fazla tanı konan ve en sık ölüme neden olan kanserdir. Bayanlarda ise en sık tanı alan dördüncü kanserdir ve en sık ikinci kanser kaynaklı ölüm nedenidir. (2). HLA-G ilk kez trofoblastlarda gösterilmiştir. İmmun sistemi baskılayıcı özelliği nedeniyle dolaşımdaki formu sHLA-G birçok araştırmacı tarafından farklı malignitelerde biobelirteç özelliği yönüyle araştırma konusu olmuştur. Çalışmamızda gruplar arasında sHLA-G seviyelerini karşılaştırarak akciğer kanseri için bir biobelirteç olup olamayacağını ve sigara kullanımının sHLA-G seviyeleri üzerine etkisini belirlemeyi amaçladık.

Çalışmaya kabul ve red kriterlerine göre akciğer biyopsi materyali patolojik olarak malign sonuçlanan 62, benign sonuçlanan 18 hasta ve sigara kullanan 40 ve kullanmayan 31 sağlıklı birey dahil edilerek dört grup oluşturulmuştur. Gruplar arasında ve grup içinde sHLA-G seviyeleri ile hastaların sigara içme alışkanlıkları, yaşları ve patoloji sonuçları ile ilişkileri araştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda sigara kullanmayan kontrol grubu ile malign tanı almış hasta grubu arasında sHLA-G seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Diğer değişkenler için ise gruplar arasında anlamlı fark elde edilememiştir.

sHLA-G ile ilgili birçok malign hastalıkta çalışmalar yapılmış olup akciğer kanserleri üzerinde etkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre sHLA-G akciğer kanseri tanısını kolaylaştıracak bir biobelirteç olarak görülmektedir ve seviyeleri sigara kullanımından bağımsızdır.

**Anahtar kelimeler:** sHLA-G, sigara kullanımı, akciğer kanseri

## İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

### INVESTIGATION OF THE RELATION BETWEEN sHLA-G LEVELS TO LUNG CANCER AND SMOKING

From the ends of 20th century lung cancers began to have an increasing ratio on preventible deaths. Globally lung cancers is the most diagnosed and death caused malign disease on men. On women it is the fourth in diagnosed malign disease and the second in malign reasoned deaths. HLA-G was shown on trophoblasts firstly. Cause of its immunosuppressor capability the circulating form sHLA-G was focused in many studies as a biomarker for malignancies. In our study we aimed to investigate if sHLA-G is a proper biomarker for the diagnosis of lung cancers and the effect of smoking on the levels of sHLA-G.

62 individual diagnosed as malign, 18 individuals diagnosed as benign, 40 individual having smoking habit and 31 individual as non smoker are accepted to the study according to the criterias of acceptance and formed four groups. It is tried to investigate in the study the relation of smoking habit, age, pathologic diagnose and the sHLA-G levels between and in the groups.

As the result of statistical analyses sHLA-G levels found markedly higher on patients groups when compared with non smoker controls. There was no difference between groups on other criterias.

sHLA-g levels was investigated on other malign diseases but only a few study had been made on lung cancers. Based on the results of our study sHLA-G seems to be a helpful biomarker for diagnosis of lung cancers and its serum levels are independent from smoking habit.

**Key words:** sHLA-G, smoking, lung cancer

## SİMGE VE KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfosittik lösemi
CD4	: <i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	: <i>Cluster of differentiation 8</i>
CEA	: Karsino embriyojenik antijen
CTL	: <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DI	: DNA indeksi
ELİSA	: <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAB	: <i>French-American-British</i>
FOB	: <i>Fleksible optic bronchoscopy</i>
HLA	: İnsan lökosit antijeni
HLA-G	: İnsan lökosit antijeni G
ILT	: <i>Inhibitory receptors ig-like transcript</i>
KLL	: Kronik lenfosittik lösemi
KAR	: <i>Killing activating receptor</i>
KIR	: <i>Killing inhibiting receptor</i>
LIR	: <i>Leucosyt Ig-like receptor</i>
MHC	: Majör doku uyum kompleksi
MICA	: <i>Major histocompatibility complex class I-related chain A</i>
NK	: <i>Natural killer</i>
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
sHLA-G	: <i>Soluble human leucocyte antigen G</i>
SPF	: s fazı farksiyonu
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TNM	: Tumor Nod Metastaz
ZAP-70	: <i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

# İÇİNDEKİLER

## Sayfalar

ÖNSÖZ .....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT) .....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	3
2.1HLA Antijenleri ve HLA-G.....	3
2.1.1 HLA antijenleri .....	3
2.1.2 HLA-G .....	4
2.1.3 HLA-G nin immun sistemi düzenleyici rolü.....	5
2.1.4 Malignitelerde HLA-G.....	7
2.1.4.1 Melanom ve HLA-G .....	7
2.1.4.2 Lösemiler ve HLA-G .....	7
2.1.4.3 HLA-G ve göğüs kanseri .....	8
2.1.4.4 Kolorektal kanserler ve HLA-G.....	9
2.2 Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi .....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	11
3.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri .....	11
3.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri.....	11
3.3. Çalışma gruplarının oluşturulması .....	11
3.4. Bronkoskopi .....	12
3.5. Malignite Tanısının Patolojik Olarak Konulması .....	12
3.6 Hastaların Evrelerinin Belirlenmesi.....	12
3.7. Hastaların ve Kontrol Gruplarının Klinik Özellikleri ve Laboratuvar ölçümleri .....	13
3.7.1 Serum sHLA-G Düzeyi Ölçümü.....	14
3.8. İstatistiksel Analiz.....	15
4.BULGULAR .....	16
4.1 Hasta Grubuna Ait Katogorik Değişkenlerin Tanımlayıcı İstatistikleri .....	16
4.2 Sigara kullanan kontrol grubuna ait istatistikleri .....	17
4.3 Sigara kullanmayan kontrol grubuna ait istatistikler .....	19



4.4 Hasta grubunda yaş, sHLA-G ve sigara kullanımı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi.....	20
4.5 Patoloji sonucu benign olan kontrol grubuna ait istatistikler.....	23
4.6 Farklı patoloji sonucuna sahip gruplarda değişkenlerin ilişkisi.....	25
4.7 Çalışma grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması.....	26
5. TARTIŞMA .....	28
6. SONUÇLAR .....	35
7. KAYNAKLAR .....	36
8. EKLER.....	42

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri 20. yüzyılın sonlarında itibaren önlenebilir ölümler arasında giderek artan bir orana sahip olmaya başlamıştır (1). Global olarak akciğer kanseri erkeklerde en fazla tanı konan ve en sık ölüme neden olan kanserdir. Bayanlarda ise en sık tanı alan dördüncü kanserdir ve en sık ikinci kanser kaynaklı ölüm nedenidir. Akciğer kanseri 2008 yılındaki toplam kanser vakası sayısının %13 (1,6 milyon)'ünü ve ölümlerin %18 (1,4 milyon)'ini oluşturmaktadır (2).

İmmun sistemin mikroplara karşı savunmanın yanında tümörlerin gelişimi ve elimine edilemesinde de rolü olduğu bilinmektedir. Bu sürece kanser immün gözetimi denilmektedir. Kanser immün gözetimi, patojenlere benzer şekilde anormal hücrelerin (displastik ve neoplastik) tanınmasını ve tümörün oluşmamasını içerir (3). İyi tanımlanmış immunojenik tümör antijenlerinin ve tümör-antijen-spesifik sitotoksik hücrelerin bulunmasına rağmen, bu antijen ve hücreler immün sistem malign hücreleri eradike etmede çok etkili görünmemektedir. Tümör hücreleri farklı yollarla değişime uğrayabilme ve konakçının immün sisteminden kaçabilme yeteneğine sahiptirler (4).

HLA-G (İnsan lökosit antijeni G) klasik olmayan bir klas 1 HLA (insan lokosit antijen) molekülüdür ve kendisini selektif olarak eksprese eden koryokarsinom hücrelerinde ilk kez tanımlanmıştır. HLA-G ekspresyonu oldukça sınırlıdır. Trofoblast gibi fetal dokulardan ekspresyonun yanında, erişkin timik medullası, cornea, pankreas adacıkları, eritroit ve endotelial hücre prekürsörlerinde esas olarak eksprese edilir. HLA-G ekspresyonu kanser, transplantasyon, multiple sclerosis, inflamatuvar hastalıklar ve viral enfeksiyonlar tarafından etkilenebilir (3). HLA-G tümör hücrelerinde ve immün kaçışta önemli role sahiptir (4).

İnsan yaşamının uzaması ile kansere bağlı ölümlerin giderek artması malignitelerin tanısı, tedavisi ve prognozunu etkileyen etmenler konusunda daha fazla bilgiye ihtiyaç olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada akciğer kanseri hastalarında, sigara kullanıcılarında ve sağlıklı bireylerde HLA-G seviyelerinin ölçülerek akciğer kanseri tanısında belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı ve akciğer kanseri etiyojisinde çok önemli bir yeri olan

sigara içiminin HLA-G düzeyi üzerine etkisi olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HLA Antijenleri ve HLA-G

#### 2.1.1 HLA antijenleri

HLA antijenleri ilk kez lökositler üzerinde gösterildiklerinden bu ismi taşımaktadırlar. Çeşitli doku ve organlar üzerindeki varlıkları organ transplantasyonlarında uyum ve red gelişiminde ve bazı romatolojik hastalıkların tanılarında önem arz etmektedir.

Kromozom haritası üzerinde p21 noktasına denk gelen ve altıncı kromozom üzerinde bulunan *MHC* (major doku uyum kompleksi) *gen region* adlı bölge tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Dünya sağlık örgütü kontrolü altındaki HLA nomenklatür komitesi tarafından üç alt gruba ayrılmaktadır. MHC sınıf 1 antijenleri HLA A, B, C, E, F, G'den; MHC sınıf 2 antijenleri HLA DR, DP, DQ, DO, DN'den; ve MHC sınıf 3 antijenleri de HLA C2, C4A, C4B, PF, TNF(*tumor necrosis factor*)-alfa ve  $\beta$ 'dan oluşmaktadır (5). HLA sınıf 1 antijenlerden E, F, G antijenleri non-klasik olarak bilinmektedirler ve daha az dokuda bulunmaktadır. MHC sınıf 2 antijenleri ise daha fazla dokuda bulunmaktadır. Yine MHC sınıf 1 antijenlerine benzer şekilde MHC sınıf 2 antijenlerinden HLA DR, DP, DQ antijenleri klasik olarak gruplandırılır. Sınıf 2 moleküller otoimmün hastalıklarda immunitenin indüklenmesinde role sahiptirler.

Sınıf 1 antijenler tüm çekirdekli hücrelerin membranlarında bulunurlar ve CD8(*cluster of differantiation 8*) T lenfositler ile köprü oluşturarak MHC aracılı immun yanıtın ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu antijenler yapılarında 15. kromozom tarafından kodlanan ve hafif zincir özellikleri barındıran  $\beta$ -2 mikroglobulin yapısında bir alt birime sahiptirler. Yapıdaki diğer bir zincir ise ağır zincir yapısında olan ve altıncı kromozom tarafından kodlanan alfa zinciridir. Sınıf 1 antijenleri arasındaki işlevsel farklılıklar ağır zinciri kodlayan sınıf 1 genlerinden kaynaklanır. Sınıf 1 moleküllerinin esas görevi hücre içerisindeki peptidleri hücre yüzeyine taşımaktır. Böylece bireye ait olmayan bu moleküller sitotoksik T lenfositler tarafından alınır ve bu hücrelerin yok edilmesine giden süreç başlar (6).

Sınıf 2 antijenler sadece antijen sunan hücrelerde bulunurlar. Bu antijenlere ait genler hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  zincirlerinin genleridir. Sınıf 2 moleküllerinin görevleri sınıf 1 molekülleri ile benzerlik göstermektedir. Sınıf 2 molekülleri ekzojen kökenli peptidleri bağlayarak hücre yüzeyine taşır. İki sınıf molekülün yapıları arasındaki farklardan dolayı da peptidlerin büyüklük ve küçüklüklerine göre bağlama kapasiteleri ve affiniteleri farklılık göstermektedir. Sınıf 1 moleküller daha küçük peptidleri bağlayabilirler. Monosit, B lenfosit gibi, sınıf 2 molekülleri sentezleyebilen hücrelere fagositozla alınan ve lizozomlarda peptidlere parçalanmış proteinler HLA-DM molekülünün yardımı ile sınıf 2 molekülüne bağlanır. Oluşan MHC-peptid kompleksi ekzositozla hücre membranına taşınır. Burada devreye CD4 (*cluster of differentiation 4*) yardımcı lenfositler girer. T lenfosit reseptörü ile sınıf 2 molekülü arasında oluşan köprü sonucunda yardımcı T lenfositlerinden interferon sentezi başlar. İnterferon ise uyarılan hücreden daha fazla sınıf 2 molekülü yapılmasını, dolayısıyla daha güçlü bir immun yanıtın ortaya çıkmasını sağlar. Tüm sitotoksik T lenfositleri, hemen tüm sınıf 1 antijenlerini tanımaktadırlar. Ancak BW4 antijeni doğal öldürücü hücre reseptörlerine bağlanabilmektedir (6).

### 2.1.2 HLA-G

Altıncı kromozomun p21 bölgesinin kısa kolu üzerinde lokalize olmasına rağmen HLA-G genetik farklılığı, yapısı, ekspresyonu ve fonksiyonu bakımından diğer HLA sınıf 1 moleküllerden ayrılır ve non-klasik olarak sınıflanır (7). HLA-G sadece 8 farklı protein çeşidi ile çok düşük oranda polimorfizm gösterir ve normal durumlarda çok kısıtlı dokularda bulunmaktadır. Trofoblastlar gibi fetal dokular, timik medulla, kornea, pankreatik adacıklar ve eritroid ve endotelial hücre prekürsörlerinde bulunmaktadır (3). HLA-G ekspresyonu bu fizyolojik durumların dışında kanserler, transplantasyon, multiple scleroz, inflamatuvar hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi patolojik durumlarda da etkilenmiş seviyelere sahiptir (3).

HLA-G'nin dördü membrana bağlı, üçü çözünmüş yedi izoformu bulunmaktadır. Membrana bağlı izoformlar HLA-G1, G2, G3 ve G4 iken, çözünmüş izoformlar HLA-G5, G6 ve G7'dir. HLA-G'nin immünsüpresif etkisi ile kanser immünitesini olumsuz etkilediği iddia edilmektedir (3,8-12). Bu etkiden sorumlu

majör izoformlar HLA-G1 ve G5'dir. Bu izoformlar etkilerini CD85j (ILT(*inhibitory receptors ig-like transcript*)2), CD85d (ILT-4), CD158d (KIR2DL4) ve CD160 (BY55) reseptörlerine bağlanarak gösterirler. CD85j (ILT-2); B, NK(*natural killer*) ve T hücreleri tarafından eksprese edilirken, CD160 (BY55); endotelial, NKve T hücreleri tarafından eksprese edilir. CD85d (ILT-4), sadece makrofajlardan CD158d (KIR2DL4) ise sadece NK hücrelerden eksprese olur (13).

Membrana bağlı yapıdaki HLA-G1 de ortamda proteolitik enzimlerin bulunması durumunda ortama salınır ve sHLA-G1 halini alır. Primer transkriptin alternatif kesilip yeniden birleştirilmesi (*alternatif splicing*) HLA-G için anahtar öneme sahiptir ve hücre tipine bağlı olabilir. Elde edilen bilgilerin çoğu HLA-G1 ve HLA-G5 moleküllerinin ölçümü ile elde edilmiştir. Bu izoformlar üç globuler alt birimden oluşmaktadır ( $\alpha$ - 1, 2, 3). Bu alt birimler non-kovalent olarak  $\beta$ -2 mikroglobuline ya da bir nonapeptide bağlıdır. Diğer izoformların 1 ya da 2 alfa birimi eksiktir. Ne  $\beta$ -2 mikroglobuline ne de mevcut peptidlere bağlıdırlar ve daha küçüktürler (7). Yüzeye bağlı eşdeğerleri gibi sHLA-G'ler de immüsupressif özelliklere sahiptir (13).

HLA-G'nin bu immüsupresif özellikleri gebelik, organ transplantasyonu ve otoimmun hastalıklar gibi durumlarda embriyonun uterin implantasyonuna yardım ederek, solid allograftların kabulüne katkı sağlayarak ve kişinin kendi bileşenlerine karşı geliştirdiği immunitiyi down-regule ederek yararlı etkilere sahip olsa da, kanser ve viral enfeksiyonlar gibi durumlarda ortaya çıkan anti-tümör ve anti-viral etkiyi azaltma özelliği ile zararlı duruma düşmektedir (14). HLA-G'nin immun baskılayıcı etkisinin kanser hastalarında gösterilmesi kendisine yeni bir belirteç olma beklentisi kazandırmış ve ayrıca yeni tedavi yöntemleri için hedef konumuna getirmiştir.

### **2.1.3 HLA-G nin immun sistemi düzenleyici rolü**

HLA-G'nin doku dağılımının kısıtlı olması, tümör hücreleri üzerinde ekspresyonunun varlığının gösterilmesi, immun gözetim sürecinde önemli bir düzenleyici role sahip olduğunu işaret etmektedir. Tümörün yok edilmesini CTL ve NK hücrelerinin CD8 ve KIR (*killing inhibiting receptor*) moleküllerine bağlanarak inhibe eder. ILT-2 (LIR (*leucosyt ig-like receptor*)-1), ILT-4 (LIR-2) ve KIR2DL4

olmak üzere 3 adet HLA-G tanıyan KIR tanımlanmıştır (15). Bu reseptörler NK hücrelerde tanımlanmalarına rağmen tüm T ve B hücrelerinde (ILT-2), monosit ve makrofajlarda (ILT-2 ve 4) ve dentritik hücrelerde (ILT-2 ve 4) de bulunmaktadır (16-17). HLA-G'nin öncü sekansı diğer klasik olmayan HLA HLA-E gibi HLA moleküllerinin hücre yüzeyinde stabilizasyonunda etkili bulunmuştur. Bu moleküller genişçe eksprese edilmiş olan KIR CD94/NKG2A reseptörleri ile etkileşim halindedir (18). Bu KIR'ler haberleşen hücreler arasında lizisi inhibe edecek sinyallerin iletimini sağlayabilirler. Yapılan bir çalışmada HLA-G1 ile transfekte edilmiş M8 melanom hücre serilerinde hem NK hem de CTL (*cytotoxic T lymphocyte*) lizisinde belirgin azalma gözlemlenmiştir (19). Daha ileri çalışmalarda HLA-G'nin maskelenmesi ve ILT-2 reseptörlerinin monokonal antibodyler ile kapatılması ile inhibisyon geri dönmüştür (20). Yapılan başka bir çalışmada T-hücrelerinin sHLA-G ile 18 saat inkübe edildikten sonra daha sonraki antijenik uyarılara cevap vermedikleri gözlemlenmiştir (21). NK hücreler KIR reseptörlerine sahip oldukları gibi NKG2D'ye benzer KAR (killing activating receptor) reseptörlerine de sahiptirler. Bu reseptörler hedefin yok edilmesi için sinyal aktiflemektedirler. Bu reseptörlere spesifik MICA (*Major histocompatibility complex class I-related chain A*) gibi ligandlar birçok tümörde upregule şekilde bulunmuştur (20). Transfekte M8 hücre serileri ile yapılmış bir çalışma NK hücre lizisinin HLA-G aracılı sağlanan inhibitör sinyalin MICA tarafından ortaya konan aktivatör sinyale üstün gelmesi ile sağlandığını göstermektedir (22).

Yukarıda anlatılan hücre aktivitesini inhibe etme özelliğinin yanında HLA-G antijenlerinin NK hücrelerinin *Rolling* ve endothelial migrasyonunu da inhibe ettiği bilinmektedir (23-24). Yapılan bir çalışmada HLA-G ekspresyonunun domuz endotel hücrelerine etkisi adezyon çalışması ile analiz edilmiş ve HLA-G'nin aktive insan NK hücrelerinin yuvarlanma ve adezyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu çalışma HLA-G molekülü ve ILT-2 etkileşiminin ve bazı bilinmeyen inhibitör NK reseptörünün NK hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek bu etkiyi oluşturduğunu öne sürmektedir (23). Başka bir çalışmada da HLA-G ile transfekte edilmiş domuz endotel hücreleri transmigrasyon deneyinde HLA-G nin yüksek oranda saflaştırılmış NK hücrelerinin erken geçişini inhibe ettiğini göstermiştir (24).

Literatürde sHLA-G diğer klasik klas 1 sHLA antijenleri gibi CD8 pozitif T hücreleri ve NK hücrelerinin apoptozisini CD8'e bağlanmalarının Fas ligand upregulasyonu oluşturması, soluble FasL sekresyonu ve aktive CD8 hücre apoptozisinin Fas/sFasL aracısı ile gerçekleşmesine neden olduğunu belirten yayınlar vardır (25). HLA-G1 inde CD4+ T lenfosit proliferasyonunun supresyonunu arttırdığı gösterilmiştir(26).

#### **2.1.4 Malignitelerde HLA-G**

HLA-G'nin maligniteler konusunda birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve araştırmacılar HLA-G'nin çeşitli maligniteler için tanı biyobelirteci olup olamayacağını, prognostik değerini ve eski biyobelirteçlerle karşılaştırılmasını çalışmalarına konu etmişlerdir (8,27-37).

##### **2.1.4.1 Melanom ve HLA-G**

Melanomda serum sHLA-G seviyeleri normal sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında daha yüksek bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda araştırmacılar sHLA-G seviyelerinin tümör yükü ve hastalığın ileri evreleri ile doğru orantılı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca IFN- $\alpha$  ile tedavi de sHLA-G'nin seviyelerini arttırmaktadır. Bu durum hastalığın evresi ve tümör yükünden bağımsızdır (27). Yapılan başka bir çalışmada HLA-G5 izoformunu sekrete eden M8 melanom hücrelerinin kendilerini doğal öldürücü hücre kaynaklı sitotoksiteden koruduğu sonucuna varmış ve buradan yola çıkarak HLA-G5 kaynaklı immuniteden kaçışı göstermişlerdir (28).

##### **2.1.4.2 Lösemiler ve HLA-G**

sHLA-G seviyelerinin akut lösemili hastalarda sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu rapor edilmektedir (15). Bu artış FAB (*french-american-british*) M4 ve M5 gibi monositik ve lenfoid seriyi etkileyen alt tiplerde %79 seviyelerinde iken, akut lenfoblastik lösemide %89'lara kadar çıkmaktadır. T hücreli ALL (akut lenfosittik lösemi)'lerde B hücrelilerden daha fazla sıklıkta yüksek seviyelere



rastlanmıştır. Akut lösemi hastalarında hastalığın gidişatı ve sHLA-G seviyelerinin ilişkisi, öncesinde myelodisplazi ve diğer lökositosis durumlarının olup olmamasına bağlıdır (29).

Primer kutanöz lenfoma hastaları ile yapılan bir çalışmada, PCR ve İmmun-histokimya vasıtası ile HLA-G ve IL-10 ekspresyonu T ve B hücre kökenli tüm kutanöz lenfomalarda tespit edilmiştir. Kutanöz B hücreli lenfomanın ağrısız tipleri HLA-G pozitif iken, kutanöz T hücreli lenfomalarda HLA-G ekspresyonu hastalığın ileri evreleri ve yüksek dereceli histoloji ile ilişkili bulunmuştur (30).

B-KLL (B hücreli kronik lenfositik lösemi)'li hastalarda yapılan bir çalışmada HLA-G ekspresyonu flow-sitometri ile tetkik edilmiş ve hastalarda HLA-G ekspresyonuna sahip lösemik hücre oranı %1 ila %34 arasında bulunmuştur. Yine bu çalışmada HLA-G pozitif ekspresyon ile progresyonsuz yaşam arasında belirgin korelasyon tespit edilmiştir. Bunun yanında HLA-G seviyeleri KLL'de kullanılan *Binet evreleme sistemine* göre A,B ve C evrelerinde belirgin olarak farklı bulunmuş ve HLA-G ile pozitif korelasyon bulunmuştur, fakat ZAP-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) ve CD38 arasında ilişki bulunamamıştır (31). Diğer bir çalışmada ise HLA-G seviyeleri yine flow-sitometri ile ölçülmüş ve ekspresyonu *real time-PCR* ile doğrulanmıştır. Bu çalışmada yine B-KLL'li hastalar üzerinde yapılmış ve ZAP-70 VE CD38 gibi bilinen prognostik belirteçler arasında ilişki bulunamamıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda HLA-G eksprese eden B-KLL hücrelerinde HLA-G'nin immün kaçışta rolü olduğuna karar verilmiştir (32). Başka bir çalışmada ise sHLA-G sıklığı B-KLL hastalarında %70, B hücreli non-hodking lenfomalarda %53 ve T-hücreli non-hodking lenfomalarda %45 olarak bulunmuştur (33).

#### 2.1.4.3 HLA-G ve göğüs kanseri

HLA-G ekspresyonu immün-histokimya ile sHLA-G (*soluble human leucocyte antigen G*) ölçümü ise *ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)* ile belirlenmiş primer göğüs kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada HLA-G ekspresyonunun göğüs kanserli hastaların %70,7 (41/58)'inde pozitif olduğu ve hastalığın ileri evrelerindeki gruplarda bu sıklığın arttığı ortaya konmuştur. Ayrıca yine bu çalışmada normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sHLA-G seviyelerinin hasta grubunda dramatik olarak arttığı belirlenmiştir ve bu sonuçların sHLA-G'nin

pre-operatif dönemde yararlı bir tanı aracı olabileceğinin gösterdiğine işaret edilmiştir (34).

Yapılan başka bir çalışmada HLA-G ekspresyonunun DNA indeks (DI) ve S fazı fraksiyonu (SPF) ile ilişkisine bakılmış, ayrıca sHLA-G seviyeleri sağlıklı kişilerle karşılaştırılmıştır. Malign örneklerin %40'ında yüzeysel HLA-G ekspresyonu saptanmış ve %24,4'ünde sitoplazmik patern tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda sHLA-G seviyelerinin maligniteli hastalarda kontrollerden belirgin seviyede yüksek bulunduğu, sitoplazmik HLA-G ile DI (DNA indeks) ve SPF (s fazı fraksiyonu) arasında negatif korelasyon olduğu ve sHLA-G ve SPF ile de aynı şekilde korelasyonun varlığı tespit edilmiştir. Bunun da hastalığın gidişatı ile ilişkisi bulunamamıştır. Bu çalışmada sonuç olarak HLA-G'nin yararlı bir prognostik belirteç olabileceği ve sHLA-G'nin göğüs kanserli hastalarda tümör belirteci olarak kullanılabilceği ortaya konulmuştur (35).

#### 2.1.4.4 Kolorektal kanserler ve HLA-G

sHLA-G seviyelerinin kolorektal kanserlerdeki durumunu ve benign/malign kolorektal kitlelerin ayırımında kullanılabilirliğinin araştırıldığı bir çalışmada *ELISA* yöntemi ile sHLA-G seviyeleri ölçülmüştür. Bu çalışmada sHLA-G seviyelerinin kolorektal kanserlerde normal kolon/rektum, hiperplastik polip, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve adenomlarından istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada bu ayırım konusunda CEA (*carsinoembrionic antigen*) ve sHLA-G karşılaştırılmış ve sHLA-G'nin daha üstün olduğu istatistiksel olarak ortaya konmuştur (36).

## 2.2 Akciğer Kanserinin Epidemiyolojisi ve Etyolojisi

Akciğer kanseri en sık görülen kanserdir ve kanser ölümlerinin en sık nedenidir. Dünyada her yıl yaklaşık bir milyondan fazla kişi akciğer kanserinden ölmektedir. Global olarak akciğer kanseri erkeklerde en fazla tanı konan ve en sık ölüme neden olan kanserdir. Bayanlarda ise en sık tanı alan dördüncü kanserdir ve en sık ikinci kanser kaynaklı ölüm nedenidir. Akciğer kanseri 2008 yılındaki toplam kanser vakası sayısının %13 (1,6 milyon)'ünü ve ölümlerin %18 (1,4 milyon)'ünü

oluşturmaktadır(2). Ülkemizde yapılan bir çalışmada insidans erkeklerde 100 000 de 52,73, kadınlarda ise 100 000 de 7,20 olarak tespit edilmiştir (38).

Sigara akciğer kanserinde sorumlu başlıca faktördür. Akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %90'ı sigara kullanmaktadır. Akciğer kanseri görölme riski sigara kullananlarda 24-36 kat daha fazladır (39). Pasif sigara iiminde de akciğer kanseri riski 2-4 kat artmaktadır (40). Sigaranın kanser yapıcı etkisinden organik bileşiklerin tam olarak yanması ile ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar en fazla sorumludur. Kanseri yapıcı etkisi, tüketilen miktara, filtre durumuna, başlama yaşına ve kullanılan kağıdın cinsine bağlıdır.

Asbest, zeolit, nikel, kadmiyum, radyasyon maruziyeti, genetik yatkınlık, yaş, siyah ırk, meslek, geçirilmiş akciğer hastalığı sekeli, A vitamininden fakir diyet de diğer sayılabilecek akciğer kanseri etyolojik faktörleridir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmaya Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Polikliniği'nde Mart 2012– Nisan 2013 tarihleri arasında değerlendirilen klinik muayene ve görüntüleme sonucu ile malignite tanısı amaçlı fleksible optik bronkoskopi (FOB) yapılan ve patoloji sonucu malignite yönünde menfi bulunan hastalar (n=62), benign olarak raporlanan (n=18) hastalar ve hastanemize farklı sağlık sorunları ile başvurmuş sigara kullanan (n=40) ve kullanmayan (n=31) bireyler çalışma kabul kriterlerine uyumlu olmaları şartıyla kabul edilmiştir.

#### **3.1. Çalışmaya Alınma Kriterleri**

Çalışma Grubuna bronkoskopi materyalinden yapılan patolojik inceleme sonucu primeri akciğerden kaynaklanan malignite tanılı hastalar dahil edilmiştir.

#### **3.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri**

Bronkoskopi materyal sonucu farklı organ malignitelerinden metastaz olarak sonuçlanmış olmak, steroid tedavisi alıyor olmak, akciğer dışı malignite hastası olmak, daha önce malignite nedeni opere olmuş olmak ve organ nakli geçirmiş olmak tüm gruplar için dışlanma kriteri olarak alınmıştır. Tüm bu olası durumlar hastalardan alınan anamnezlerle ve tıbbi kayıtların incelenmesi ile belirlenmiştir.

#### **3.3. Çalışma gruplarının oluşturulması**

Yatığımız çalışmada bireyleri patolojik olarak akciğer kanseri tanısı almış grup, patolojik olarak benign kitle tanısı almış grup, sigara kullanan erişkin grubu ve sigara kullanmayan erişkin grubu olmak üzere dört gruba ayırdık.

### 3.4. Bronkoskopi

Hastaların bronkoskopi işlemi deneyimli göğüs hastalıkları uzmanları tarafından yapıldı. Bronkoskopi sırasında sitolojik inceleme için lavaj örneği ve patolojik inceleme için biyopsi örneği alındı.

### 3.5. Malignite Tanısının Patolojik Olarak Konulması

Alınan bronkoskopi materyalleri hastanemiz Patoloji Laboratuvar'ında incelenerek hastaların patolojik tanıları konuldu. Tanılar küçük hücreli ve küçük hücreli dışı olarak sınıflandıktan sonra, küçük hücreli dışı akciğer kanserleri belirlenebildiği oranda alt gruplara ayrıldı.

### 3.6 Hastaların Evrelerinin Belirlenmesi

Hastaların evreleri TNM(tumor,nod,metastaz) sistemine göre aşağıdaki tabloya uygun olarak yapılmıştır.

**Tablo 1:** Akciğer kanserinde TNM evreleme sistemi

Primer Tümör Büyüklüğü (T)	
Tx	Balgam ya da bronş lavajında malign hücrelerin tespit edilip görüntüleme tetkikleri ya da bronkoskopi ile tümörün gösterilememesi
Tis	Primer tümör belirtisi yok
T0	Karsinoma in situ
T1	En geniş çapı <3 cm, akciğer ya da visseral plevra ile çevrili, bronkoskopide lümen bronşundan daha proksimale invazyon göstermeyen, ana bronşun proksimaline uzanan bronşial duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör
T2	Tümör aşağıdakilerden en az birine sahip olacak: <ul style="list-style-type: none"><li>• En geniş çapı &gt;3 cm</li><li>• Ana bronş invaze ancak karınaya uzaklık &gt; 2 cm</li><li>• Visseral plevra invazyonu</li><li>• Hiler bölgeye ulaşan ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi ya da obstrüktif pnömoni</li></ul>

	T2a en büyük çapın >3 cm fakat ≤5 cm olması T2b en büyük çapın >5 cm fakat ≤7cm olması
T3	Tümörün çapı 7cm den büyük yada aşağıdaki durumlardan birine sahip <ul style="list-style-type: none"> <li>• Göğüs duvarı(süperior sulkus tümörleri dahil), diyafragma,frenik sinir,mediastinal plevra,parietal perikard invazyonu</li> <li>• Tümör ana bronşda karinayı tutmadan 2 cm den daha yakın mesafede</li> <li>• Akciğerin tamamını kapsayan atelektazi yada obstrüktif pnömoni</li> <li>• Tümörle aynı lobda satellit nodül</li> </ul>
T4	Tümörün herhangi bir büyüklükte olup mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, özefagus, vertebral kolon, karina gibi yapılardan herhangi birini invaze etmesi; veya malign plevral veya perikardial sıvı ile birlikte olan tümör; tümörle aynı lop içinde satellit tümör nodül ve nodülleri
Lenf Nodu Tutulumu (N)	
Nx	Bölgesel lenf nodlarının değerlendirilememesi
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı taraf peribronşial ve/veya aynı taraf hiler lenf nodu metastaz ve primer tümörün direkt yayılması ile intrapulmoner bezlerin tutulması
N2	Aynı taraf mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Karşı taraf mediastinal,hiler; aynı veya karşı taraf supraklavikular veya skalen lenf bezi metastazı
Uzak Metastaz varlığı	
M0	Uzak metastaz yok.
M1	Uzak metastaz var.  M1a :karşı akciğerde metastatik nodül: malign plevral veya perikardiyal effüzyon veya plevrada tümör nodülleri.  M1b : uzak organ metastazı

### 3.7. Hastaların ve Kontrol Gruplarının Klinik Özellikleri ve Laboratuvar Ölçümleri

Çalışmaya alınacak olan hastaların öyküleri alınıp, rutin fizik muayeneleri göğüs hastalıkları uzmanı tarafından yapılmıştır. Hastalardan bronkoskopi tetkiki yapılmadan önce sHLA-G seviyelerinin ölçülmesi için 8cc'lik jell seperatörlü pıhtı aktivatörü içeren serum tüpüne numune alınmıştır. Kontrol grubu hastalarının

anamnezleri alındıktan sonra numune toplama işlemi uygulanmıştır. 4 cc kan tüpte 30 dakika bekletilip pıhtılaştıktan sonra, 3000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilerek elde edilen hastalara ve kontrol grubuna ait serum örnekleri üç ayrı eppendorf tüpe paylaştırılarak çalışma yapılacak zamana kadar -20°C de saklanmıştır.

Tüm örnekler toplandıktan sonra sHLA-G düzeyleri, *Human soluble leucocyte antigen G1 ELISA kit* (Eastbiopharm co.ltd. Çin Halk Cumhuriyeti) kullanılarak Düzce Üniversitesi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı.

### 3.7.1 Serum sHLA-G Düzeyi Ölçümü

Serum sHLA-G düzeyleri *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) yöntemiyle çalışıldı. Bu yöntem klinik analizde yaygın olarak kullanılan heterojen bir tekniktir. ELISA'da kullanılan antijen ve antikorlar steril koşullarda yıllarca saklanabilir. Özgül antijen-antikor bağlanmasının antikorlara alkalin fosfataz veya horseradish peroksidaz gibi bir enzim bağlanması ve bu enzim substratının renkli ürünlere dönüştürülmesi suretiyle gösterilmesi esasına dayalı immünokimyasal ölçüm tekniğidir. ELISA yönteminde özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin miktarını, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarı ölçülebilmektedir. Hastaların sHLA-G seviyelerinin ölçümünde Eastbiopharm firmasına ait human soluble HLA-G araştırma kiti kullanılmış ve direktiflere göre aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

- Tüm numuneler ve kit materyalleri oda sıcaklığına getirildi.
- Standart reaktifi farklı oranlarda dilüe edilerek altı adet standart solusyonu elde edildi.
- Kör için ayrılan kuyucuklara sadece kromojen A ve B solusyonu ile stop solusyonu eklendi.
- Standartlar için ayrılan kuyucuklara 50 ml standart solusyonu ve 50 ml streptavidin-HRP eklendi.
- Örnekler için ayrılan kuyucuklara 40 ml örnek, 10 ml sHLA-G antibody ve 50 ml streptavidin-HRP eklendi.

- Daha sonra plate 37 °C 60 dakika *shaker* üzerinde inkübe edildi.
- Yıkama solusyonu 30 kat distile su ile dilüe edildi ve her kuyucuk için 0,350 ml kullanılacak şekilde otomatik ELISA plate yıkama cihazı ile beş kez yıkandı
- 50 ml kromojen solusyon A ve 50 ml kromojen solusyon B tüm kuyucuklara eklendi ve plate 37 °C de 10 dakika boyunca ışık görmeyecek şekilde inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklara stop solusyonu eklendikten sonra kuyucuklardaki maviden yeşile olan renk değişimi gözlemlendi ve *biotek epoch* (A.B.D) marka elisa plate okuyucu ile 450 nm dalga boyunda köre karşı okutuldu.
- Standartların absorbasnları ile elde edilen grafik vasıtası ile numunelerin seviyeleri hesaplandı.

### **3.8. İstatistiksel Analiz:**

Verilere ait tanımlayıcı değerler ortalama, standart sapma, sayı ve % frekanslar olarak tablo ve grafikler halinde verilmiştir. Gruplarda yaş, sigara adedi ve sHLA-G arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analizi ile incelenmiştir. Ayrıca gruplar arası ve patoloji sonuçları arasında yaş, sigara adedi ve sHLA-G bakımından gözlenen farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. Hesaplamalarda PASW (ver. 18) programı kullanılmış ve 1. Tip hata yapma olasılığı %5 olarak alınmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Hasta Grubuna Ait Kategorik Değişkenlerin Tanımlayıcı İstatistikleri

Hasta grubunu oluşturan bireylerin patoloji sonuçlarının dağılımları; adenokarsinom (AC) tanısı alan hasta sayısı 10 (%16,1), non small cell karsinom (alt tipi belirlenememiş) tanısı alan hasta sayısı 27 (%43,5), squamoz cell karsinom tanısı alan hasta sayısı 17 (%25,8) ve small cell karsinom tanısı alan hasta sayısı 8 (%12,9) dir (Tablo 2). Hasta grubuna ait diğer kategorik değişkenler aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir. Kategorik değişkenler sadece hasta grubu için mevcuttur. Hastaların 27 tanesinin evreleme işlemi yapılabilmektedir.

**Tablo 2:** Kanser alt tipi kategorik değişkeni için tanımlayıcı istatistikler

Alt tip	Sayı	%
adenocarsinom	10	16,1
non small (alt tipi belirsiz)	27	43,5
squamoz cell	17	27,4
small cell	8	12,9

**Tablo 3:** Evre kategorik değişkeni için tanımlayıcı istatistikler

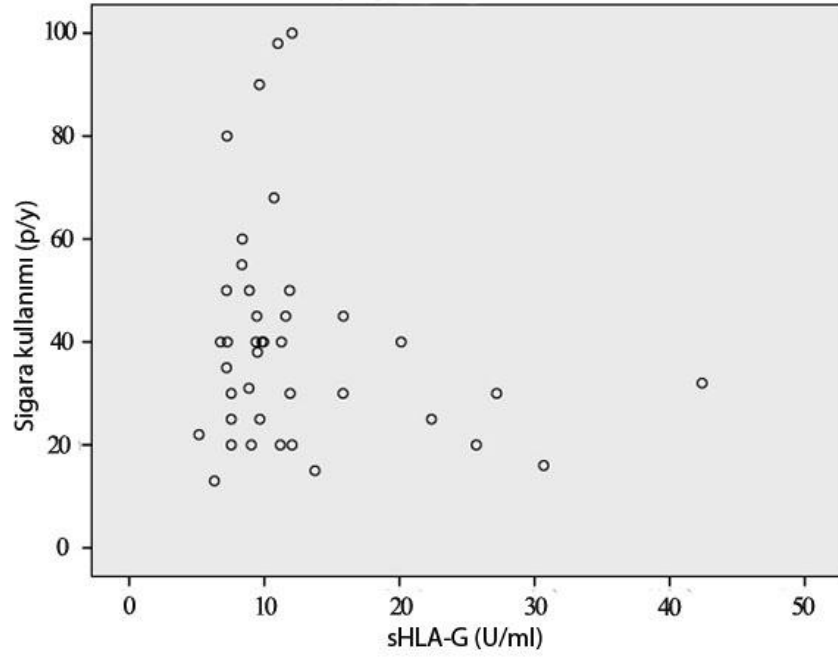
Evre	Sayı	%
1A	2	7,4
1B	3	11,1
2A	1	3,7
3A	1	3,7
3B	6	22,2
4	14	51,9
<b>Toplam</b>	<b>27</b>	<b>100,0</b>

#### 4.2 Sigara kullanan kontrol grubuna ait istatistikler

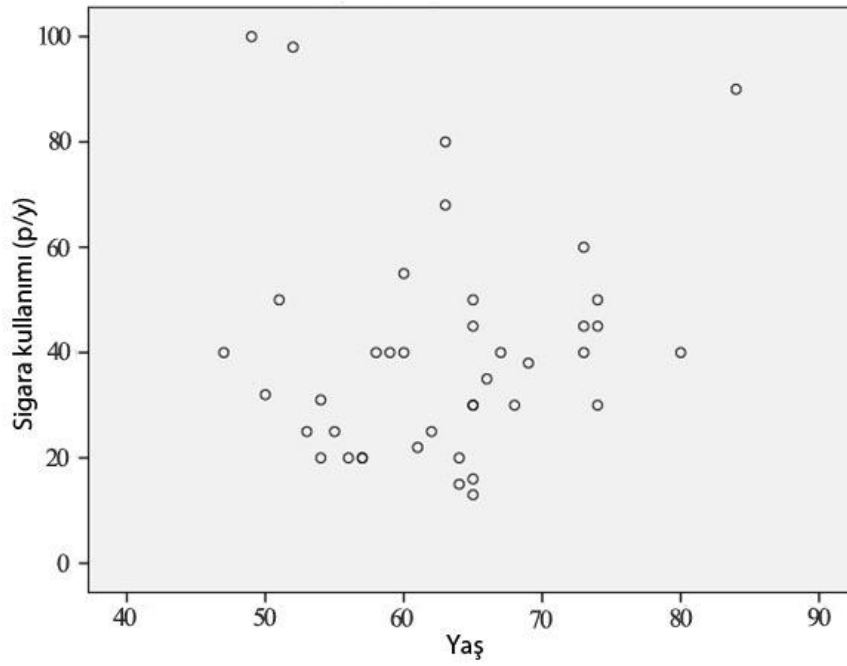
Bu grup için bireylerin sigara alışkanlıkları, yaşları ve sHLA-G düzeyleri arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Hiçbir değişken arasında anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. (sigara adedi-sHLA-G  $p=0,203$ ; sigara adedi-yaş  $p=0,646$ ; sHLA-G-yaş  $p=0,488$ ). Değişkenler arasındaki ilişki tablo 4 ve şekil 1-3’de gösterilmektedir

**Tablo 4:** Sigara kullanan kontrol grubunda değişkenlerin ilişkisi

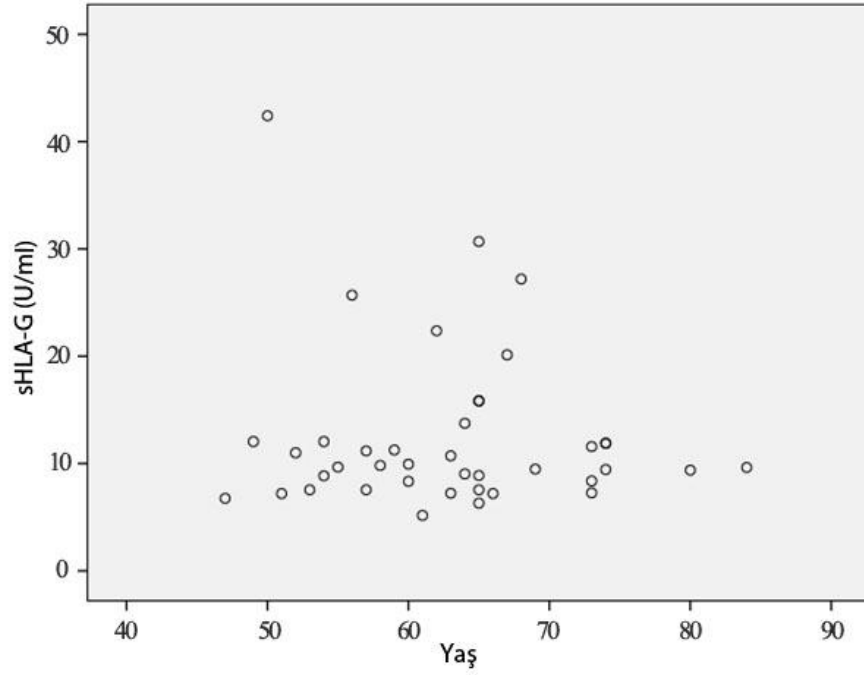
		sHLA-G	Yaş
<b>Sigara p/y</b>	r	0,205	0,075
	p	0,203	0,646
	N	40	40
<b>sHLA-G</b>	r		0,113
	p		0,488
	N		40



**Şekil 1:** Sigara kullanan kontrol grubunda sHLA-G ve sigara kullanımı arasındaki ilişki



**Şekil 2:** Sigara kullanan kontrol grubunda yaş ve sigara kullanımı arasındaki ilişki



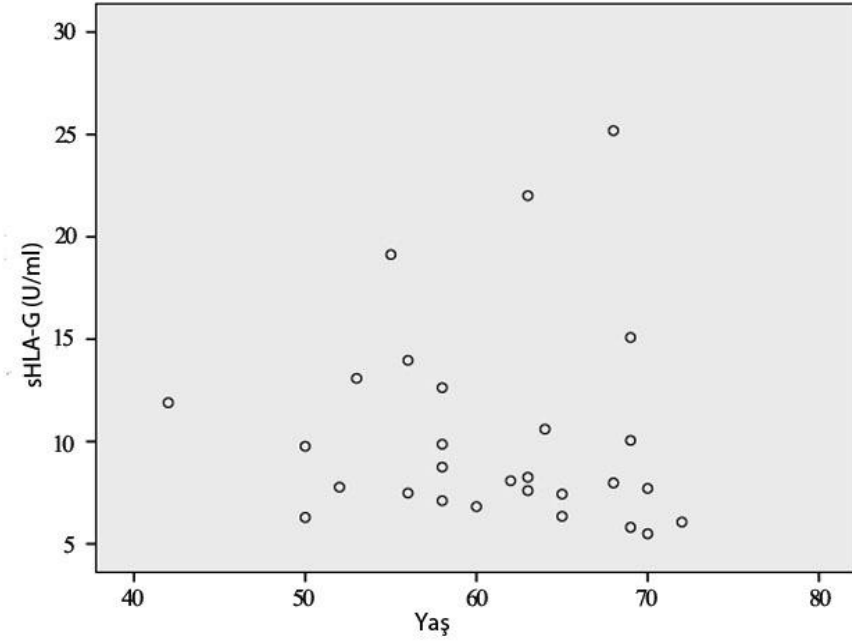
**Şekil 3:** Sigara kullanan kontrol grubunda yaş ve sHLA-G ilişkisi

#### 4.3 Sigara kullanmayan kontrol grubuna ait istatistikler

Sigara kullanmayan bireylerden oluşan kontrol grubunda bireylerin yaş ve sHLA-G seviyeleri arasında istatistiki ilişki bulunamamıştır ( $p=0,742$ ) (Tablo 5, Şekil 4).

**Tablo 5:** Sigara kullanmayan grupta sHLA-G ve yaş ilişkisi

		<b>Yaş</b>
<b>sHLA-G</b>	r	0,065
	p	0,742
	N	31



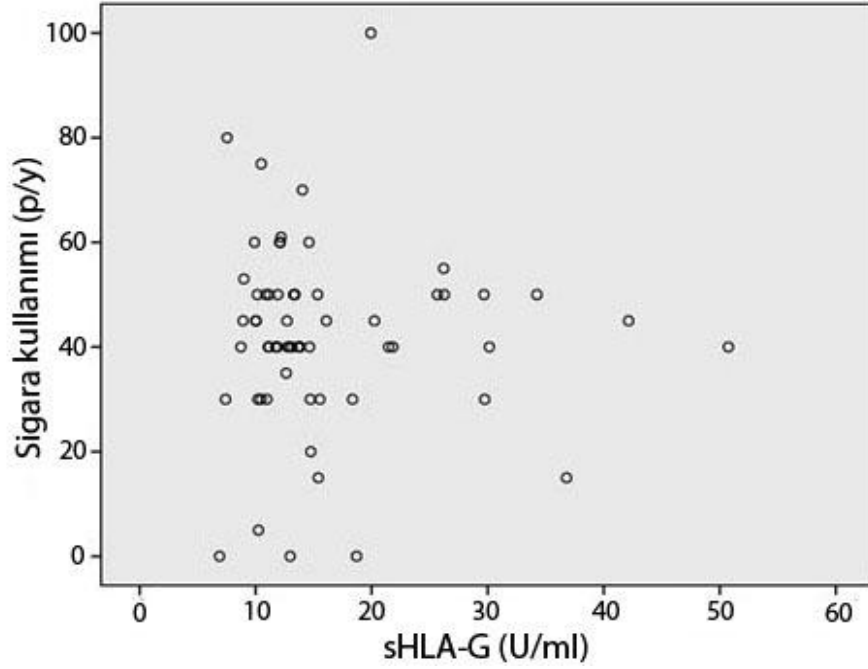
**Şekil 4:** Sigara kullanmayan grupta sHLA-G ve yaş ilişkisi

#### **4.4 Hasta grubunda yaş, sHLA-G ve sigara kullanımı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi**

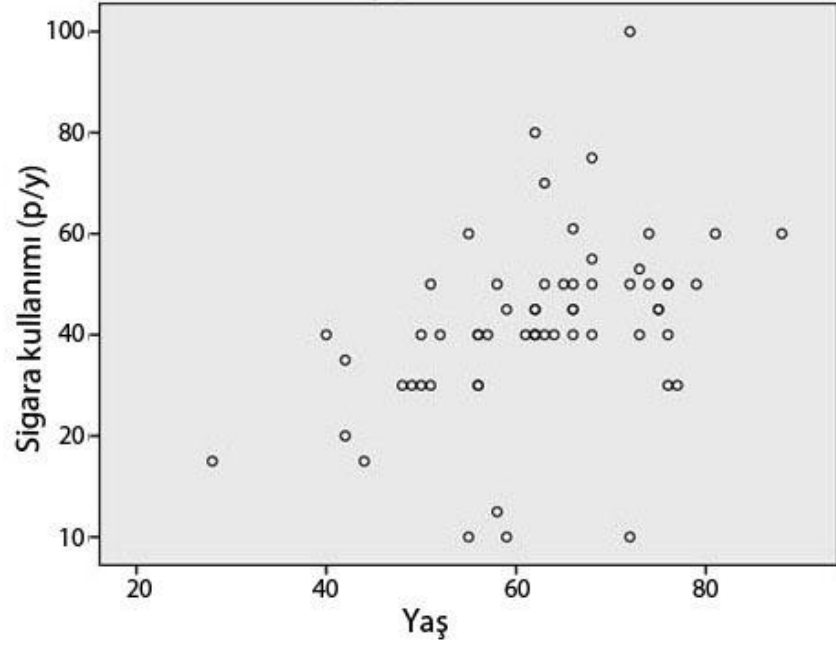
Hasta grubu için sigara adedi ve yaş ile sHLA-G seviyeleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı (sırasıyla  $p=0,886$  ve  $0,803$ ) (Tablo 6, şekil 5-7). Yaş arttıkça, sigara içme adedinin de anlamlı derecede arttığı görülmektedir ( $p=0,001$ ) ve bu artışın derecesi de  $0,422$ 'dir.

**Tablo 6:** Hasta grubunda yaş, sHLA-G ve sigara kullanımı arasındaki ilişki

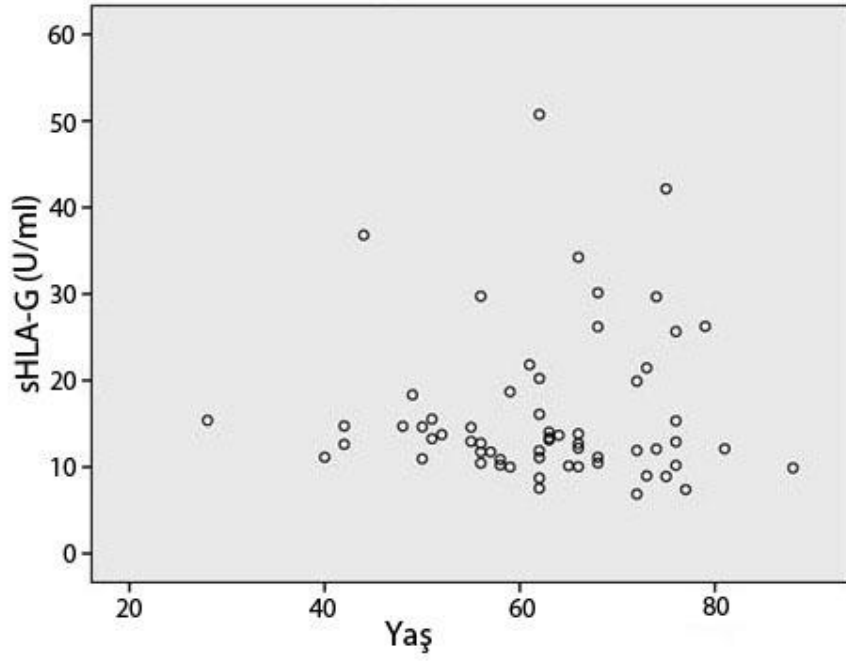
		sHLA-G	Yaş
Sigara p/y	r	0,019	<b>0,422**</b>
	p	0,886	<b>0,001</b>
	N	62	62
sHLA-G	r		0,032
	p		0,803
	N		62



**Şekil 5:** Hasta grubunda sHLA-G ve sigara kullanımı arasındaki ilişki



Şekil 6: Hasta grubunda yaş ve sigara kullanımı arasındaki ilişki



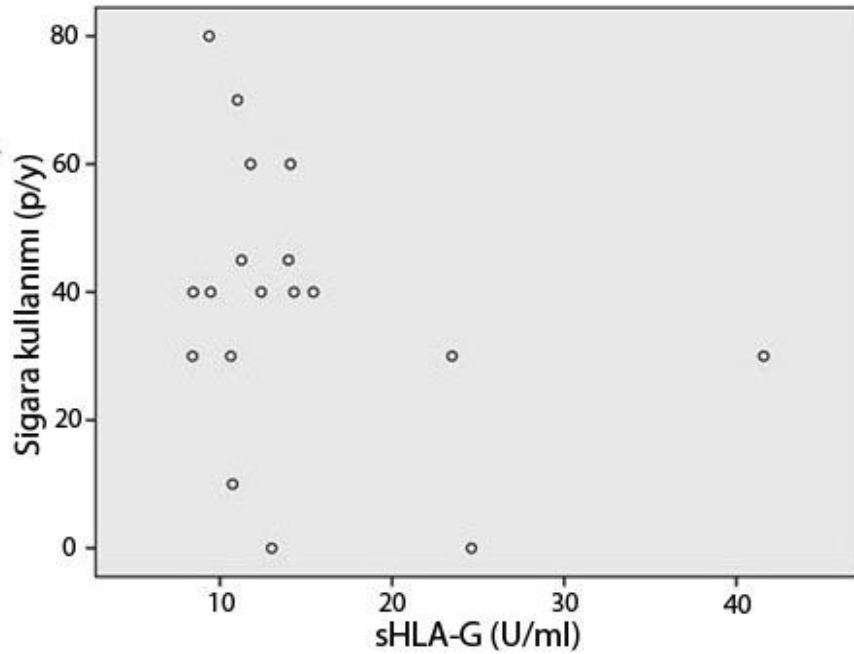
Şekil 7 : Hasta grubunda sHLA-G ve yaş arasındaki ilişki

#### 4.5 Patoloji sonucu benign olan kontrol grubuna ait istatistikler

Patoloji sonucu benign olan kontrol grubunda değişkenler arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır (sigara adedi-sHLA-G  $p=0,228$ ; sigara adedi-yaş  $p=0,152$ ; sHLA-G-yaş  $p=0,27$ ). Tablo 7’de sigara adedi, sHLA-G ve yaş değişkenleri arasındaki ilişkiler verilmektedir.

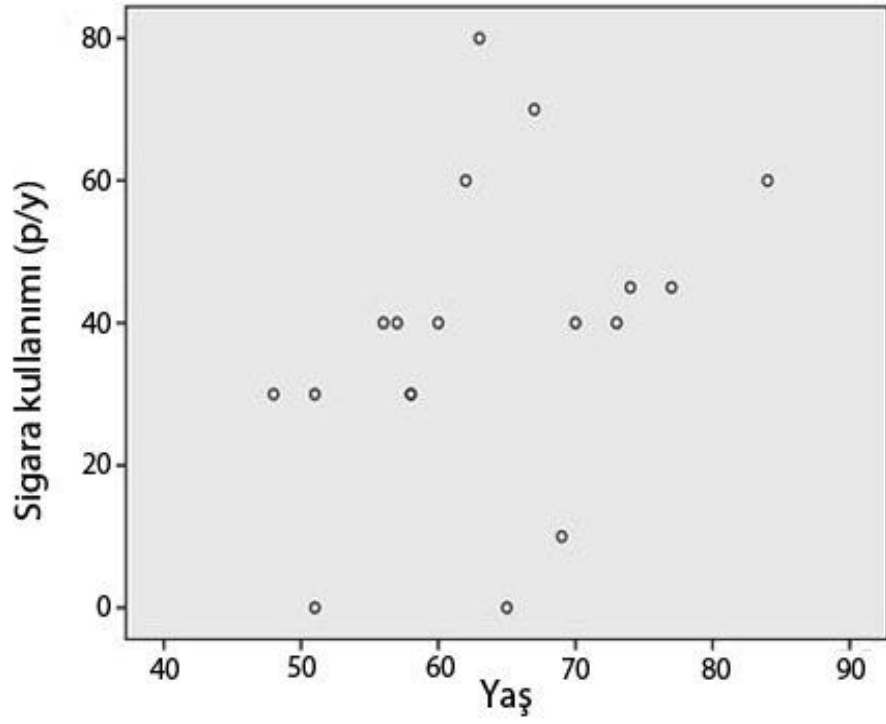
**Tablo 7:** Benign kontrol grubunda değişkenlerin ilişkisi

		sHLA-G	YAŞ
Sigara p/y	r	0,299	0,352
	p	0,228	0,152
	N	18	18
sHLA-G	r		0,271
	p		0,277
	N		18

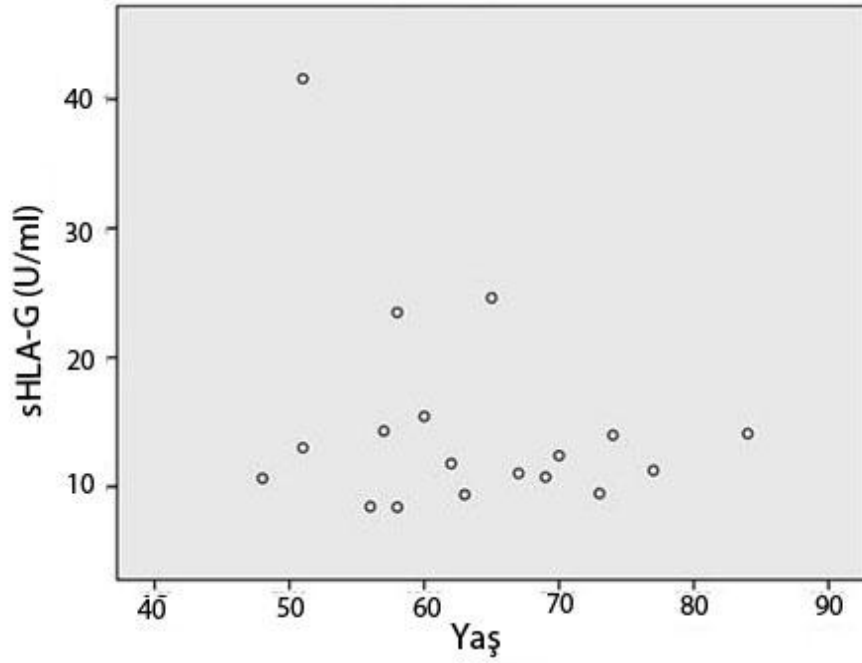


**Şekil 8:** Benign kontrol grubunda sigara içimi ve sHLA-G seviyelerinin ilişkisi





Şekil 9: Benign kontrol grubunda sigara içimi ve yaş ilişkisi



Şekil 10: Benign kontrol grubunda yaş ve sHLA-G seviyelerinin ilişkisi

#### 4.6 Farklı patoloji sonucuna sahip gruplarda değişkenlerin ilişkisi

Hastalar patoloji sonuçlarına göre gruplandırılarak her grup için değişkenler arasındaki ilişki incelenmiştir. sHLA-G, yaş ve sigara kullanımı değişkenleri bakımından, hastaların patoloji sonuçları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (sHLA-G için  $p=0,918$ ; Yaş için  $p=0,193$ , Sigara adedi için  $p=0,369$ ). Veriler Tablo 8 ve 9’da sunulmuştur. Patoloji sonuçlarının small cell karsinom ve diğer karsinom türleri olarak ayrılması ile oluşturulan iki grup arasında sHLA-G seviyelerinin farkı olup olmadığı araştırılmıştır ve iki grup arasında istatistiksel fark bulunamamıştır (Tablo 8).

**Tablo 8:** Small ve non small cell gruplarının sHLA-G yönünden değerlendirilmesi

	Grup	N	Mean	Std. sapma	P değeri
sHLA-G	Diğer	54	15,86363	8,563890	0,518
	Small cell	8	18,02213	10,105731	

**Tablo 9:** Farklı patoloji sonucuna sahip gruplarda değişkenlerin ilişkisi

Değişken	Grup	N	Mean	Std. sapma	Minimum	Maksimum	P
Sigara p/y	adenocarsinom	10	35,0000	15,63472	0,00	50,00	0.369
	non small(alt tipi belirsiz)	27	40,7407	17,90486	0,00	80,00	
	squamos cell	17	46,1765	10,68431	30,00	70,00	
	small cell	8	46,7500	29,02093	5,00	100,00	
Yaş	adenocarsinom	10	59,5000	10,25508	42,00	76,00	0.193
	non small(alt tipi belirsiz)	27	60,5185	11,62349	28,00	81,00	
	squamos cell	17	67,4118	10,89185	49,00	88,00	
	small cell	8	62,6250	10,95364	44,00	74,00	
sHLA-G (U/ml)	adenocarsinom	10	16,05360	7,402120	6,880	29,741	0.918
	non small(alt tipi belirsiz)	27	16,13141	9,910048	7,534	50,739	
	squamos cell	17	15,32659	7,216619	7,399	34,237	
	small cell	8	18,02213	10,10573	8,980	36,796	

#### 4.7 Çalışma grupları arasında değişkenlerin karşılaştırılması

Çalışma grupları arasında sHLA-G, yaş ve sigara kullanımı değişkenleri bakımından karşılaştırılmıştır. Sigara içmeyen kontrol grubunun sHLA-G ortalaması, hasta grubunun sHLA-G değeri ortalamasından anlamlı derecede düşük çıkmıştır ( $p=0.04$ ). Yaş değişkeni bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ( $p=0,813$ ). Sigara adedi bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir ( $p=0,756$ ). Tanımlayıcı istatistiklere bakıldığında; sigara içen kontrol grubu için sHLA-G değişkeninin ortalaması 12,45; standart sapması 7,59; minimum değeri 5,16; maksimum değeri 42,20'dir. Veriler tablo 11'de sunulmuştur. Sigara kullanan ve kullanmayan kontrol grupları birleştirilerek yapılan analizde yeni kontrol grubu ile hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir (Tablo 10).

**Tablo 10:** Yeni kontrol grubu ile hasta grubunun sHLA-G seviyeleri arasındaki fark

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maksimum	P
<b>Yeni kontrol</b>	71	11,33	6,01	5,163	42,400	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Hasta</b>	62	16,142	8,71	6,880	50,739	

**Tablo 11:** Grupların sHLA-G, yaş, sigara kullanımı değişkenleri bakımından karşılaştırma sonuçları

		N	ortalama	Standart sapma	Minimum	Maksimum	p
<b>sHLA-G (U/ml)</b>	<b>sigara içen kontrol</b>	40	12,45	7,586	5,163	42,400	<b>0,04</b>
	<b>sigara içmeyen kontrol</b>	31	10,21	4,774	5,496	25,186	
	<b>hasta</b>	62	16,14	8,716	6,880	50,739	
	<b>benign</b>	18	14,66	8,073	8,409	41,580	
<b>Yaş</b>	<b>sigara içen kontrol</b>	40	62,85	8,624	47,00	84,00	0,813
	<b>sigara içmeyen kontrol</b>	31	60,92	7,448	42,00	72,00	
	<b>hasta</b>	62	62,51	11,310	28,00	88,00	
	<b>benign</b>	18	63,50	9,751	48,00	84,00	
<b>Sigara p/y</b>	<b>sigara içen kontrol</b>	40	40,32	21,689	13,00	100,00	0,756
	<b>sigara içmeyen kontrol</b>	0	.	.	.	.	
	<b>hasta</b>	62	42,08	17,772	0,00	100,00	
	<b>benign</b>	18	38,33	21,420	0,00	80,00	

## 5. TARTIŞMA

HLA-G normal koşullarda vücutta sadece trofoblastlar gibi fetal dokular, timik medulla, kornea, pankreatik adacıklar ve eritroid ve endotelial hücre prekürsörlerinde bulunmaktadır(3). Bu özelliği kanser tanısında spesifite yönünden artı bir özelliktir. Fakat HLA-G; kanserler, transplantasyon, multiple scleroz, inflamatuvar hastalıklar, steroid kullanımı ve viral enfeksiyonlar gibi patolojik durumlarda da etkilenmiş seviyelere sahiptir(3). Biz çalışmamızın red kriterleri arasına tanı konmuş otoimmün hastalığı olmak, tanıli akciğer dışı malign hastalığı olmak, herhangi bir organ transplantasyonu geçirmiş olmak ve steroid kullanıyor olmayı dahil ederek analizlerimizin spesifitesini arttırmayı hedefledik. Yapılan deneysel bir çalışmada *Lin ve ark(37)* akciğer adenokarsinomlu hücre serilerine HLA-G1'i transfekte etmişler ve NK-92 hücrelerinin sitoliz kapasitesinin belirgin oranda düştüğünü tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada T-hücrelerinin sHLA-G ile 18 saat inkübe edildikten sonra daha sonraki antijenik uyarılara cevap vermedikleri gözlemlenmiştir(21). Literatürde de HLA-G'nin immün sistem üzerinde baskılayıcı etkisinin bulunduğu da birçok kez belirtilmiştir. Bizim çalışmamızdaki amacımız akciğer kanseri hastalarında sHLA-G'nin immün sistem baskılayıcı özelliğini gösteriyor olmasının bir tanı belirteci olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlemektir. Literatürde akciğer kanseri hastalarında HLA-G'nin dolaşımında bulunan formlarının incelendiği çalışmalar sınırlı sayıda bulunmaktadır. Bu çalışmalardan *Schütt ve ark(8)* yaptıkları çalışmada akciğer kanseri hastalarında sHLA-G seviyelerini sağlıklı kontrollere göre anlamlı derece yüksek bulmuşlardır. Yine *Cao ve ark(41)* kolorektal, gastrik, özefagial ve akciğer kanserli hastalarda sHLA-G nin biyobelirteç olarak değerini belirlemeye çalıştıkları çalışmalarında sHLA-G seviyelerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulduklarını bildirmişlerdir. Aynı sonuçlar nonsmall cell karsinom hastaları ile yaptıkları çalışmada *Lin ve ark.(37)* tarafında da yayınlanmıştır. Bizim çalışmamızda da gruplar arasında sHLA-G, yaş ve sigara kullanımı değişkenleri bakımından karşılaştırılmıştır. Sigara içmeyen kontrol grubunun sHLA-G ortalaması, hasta grubunun sHLA-G değeri ortalamasından anlamlı derecede düşük çıkmıştır (p=0.04). Yaş değişkeni bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir

( $p=0,813$ ). Sigara adedi bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemektedir ( $p=0,756$ ). Bizim çalışmamızda oluşturduğumuz gruplar arasında yaptığımız istatistiksel değerlendirmelerde sigara kullanmayan kontrol grubu ile hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p=0,04$ ). Bizim çalışmamızdaki sigara kullanan ve kullanmayan iki kontrol grubunun birleştirilerek istatistik analizin tekrarlanması ile de hasta grubunda sHLA-G seviyelerinin daha belirgin şekilde anlamlı hale geldiği görülmüştür ( $p<0,001$ ).

Primer tümörler oluşmakta iken daha az invaziv ve metastatiktirler. Kanserinin immün sistem tarafından düzenlenmesinde hastanın immün sistemi tümörün elimine edilmesinde ve immüniteye direçli formlarının ortaya çıkışını kolaylaştırmada rol alır. Her kanser hücrelerinin genetik değişim kapasitesi vasıtası ile primer tümörde bulunmayan genetik, fenotipik ve biyolojik karakterleri farklı olan metastatik hücreler gelişir (42). Bu değişimlerin ötesinde MHC sınıf 1 antijenlerindeki kısmı ya da tam kayıp tümör progresyonunda sık gerçekleşen bir hadisedir. İnsan tümörlerinde birçok değişime uğramış HLA fenotipi tanımlanmıştır. Bunlara HLA'nın total kaybı, HLA haplotip kaybı, HLA ya özel lokusun down regulasyonu, HLA'nın allelik kaybı ve bunların kombinasyonları örnek verilebilir (43). HLA ekspresyon anormallikleri sadece sitotoksik T- lenfositlere özel HLA sınıf 1 antijenlerin varlığını değil aynı zamanda NK hücrelerinde tümörü parçalama hassasiyetini etkiler (44,45).

Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda HLA sınıf 1 ekspresyonunun down regule edilme sıklığı %25 ila 90 arasında bulunmuştur(46-49). HLA sınıf 1 antijenlerinin ekspresyonunun her zaman sitotoksik T lenfositlerin tümörü parçalama hassasiyetlerindeki azalma ile beraber olmadığını hatırlamak gerekir(50). Fakat HLA sınıf 1 defektli tümör varyantları ortaya çıktıktan sonra, T hücreleri bu hedefleri tanıyamaz ve bu durum tümöre büyüme avantajı sağlar, bu avantaj varyantın diğer tümör topluluklarına HLA-G gibi immün baskılayıcı meleküllerin ekspresyonu ile sayısal üstünlük kurmasını sağlar (51).

1998 de HLA-G ekspresyonunun tümör hücrelerinde ilk kez gösterilmesinden sonra kolorektal kanserler, retinablastom, over kanserleri, göğüs kanserleri, hematopoetik sistem tümörleri, renal hücreli karsinom ve akciğer kanseri gibi tümör türlerinde HLA-G'nin insitu ekspresyonunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (4).

HLA-G ekspresyonunun insitu varlığının yanında belli bazı kanser türlerinde sHLA-G moleküllerinin dolaşımında yüksek miktarda buldukları belirlenmiştir. Bunlara glioblastome multiforme, göğüs ve over kanserleri, lenfoblastik ve monositik akut lösemi, malign melanom, nöroblastom ve akciğer kanseri örnek verilebilir (8,13,15,27,34).

Yaptığımız çalışmada bireyleri patolojik olarak akciğer kanseri tanısı almış grup, patolojik olarak benign kitle tanısı almış grup, sigara kullanan erişkin grubu ve sigara kullanmayan erişkin grubu olmak üzere dört gruba ayırdık. Yapılan çalışmada gruplar arasında ve gruplar içinde sHLA-G molekülünün sigara kullanımı ve patolojik tanıları ile ilişkisini araştırdık. Gruplar arasında yaş ortalamalarını denk tuttuk. Gruplar arasın istatistiklerde de yaşın gruplar arsında farklılık göstermediği görülmektedir. Bu durum bize sHLA-G'nin yaştan etkilenebilme olasılığını elimine etme şansı verdi.

Çalışmamızda hasta grubunu oluşturan bireylerin patoloji sonuçlarının dağılımları şöyledi: Adenokarsinom tanısı alan hasta sayısı 10 (%16,1), non small cell karsinom tanısı alan ve alt tipi belirlenemeyen hasta sayısı 27 (43,5),squamoz cell karsinom tanısı alan hasta sayısı 17 (%25,8) ve small cell karsinom tanısı alan hasta sayısı 8 (%12,9) idi. Bu dağılımda squamoz cell karsinom ve small cell karsinom oranlarının literatür verileri ile uyum içinde olduğu görülmektedir (52). Fakat adenokarsinom oranımızın %16,1 olarak görünmektedir. Bu uyumsuzluğun nedeninin çalışmamızda nonsmall cell karsinom olarak tanımlanmış hastaların oranındaki (%43,5) yüksekliğe bağlıyoruz.

Çalışmamızda sHLA-G düzeyi ölçümlerimizi ELISA metodunu kullanarak yaptık. sHLA-G ölçümlerimizde sadece G1 alt tipine özel antikorlar içeren bir elisa kiti kullandık. G1 alt tipi normalde HLA-G'nin membrana bağlı bulunan bir formudur. Bu form sadece ortamda proteolitik enzimlerin varlığında dolaşıma geçebilir yani sHLA-G1 halini alır. İmmun sistemin kanser hücreleri ile mücadelesi sırasında ortama salınan proteolitik enzimler sHLA-G1 in dolaşımında varlığına neden olabilirler. *Polakova ve ark(53)* B-Hücreli lenfosittik lösemi hastalarında hem total olarak G1 ve G5 formlarını beraber ölçmüşler hem de G5 formunu tek başına ölçmüşlerdir. Çalışmaları sırasında hastaların çoğunda G1 ve G5 formunun yapıldığı ölçümde sHLA-G'yi yüksek bulmuşlar ve sadece G5 formu ile yapılan ölçümde ise

sadece birkaç hastada yüksekliğe rastlamışlardır. Sonuç olarak B-Hücreli lenfosittik lösemi hastalarında buldukları sHLA-G yüksekliğinin proteolitik enzimler vasıtası ile membrandan koparak dolaşıma geçen G1 formundan kaynaklandığı kanısına varmışlardır. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan test kitleri G1 ve G5 (37) formlarına karşı antikorları kullanarak ölçüm yapmışlardır. Biz G1 formunun sadece proteolitik enzimlerin varlığında dolaşıma geçiyor olmasının sHLA-G ölçümümüzün kansere spesifitesini arttırdığını düşünüyoruz.

Hasta grubundaki evreleme işlemi yapılmış hastaların evreleri incelendiğinde %51.9 (n=14)'ünün evre 4 ve %22.2 (n=6)'sının evre 3B olduğu görülmektedir. Bu dağılım hastaların tanılarının ilerleyen evrelerde konulabildiğinin göstergesidir. Bu durumun nedeni hastaların büyük çoğunluğunun sigara kullanıyor olması ve akciğer kanserinin erken bulguları olan öksürük ve nefes darlığı gibi semptomları sigara kullanımına bağlayarak normal karşılamalarıdır. Bu tablo akciğer kanserinin erken teşhis edilmesi için bir biyobelirteç olan ihtiyacın da göstergesidir.

Sigara kullanan kontrol grubumuz toplamda 40, Sigara kullanmayan kontrol grubumuz toplamda 31 bireyden oluşmaktaydı. Yaptığımız analizlerde sigara kullanım miktarı ve yaş ile sHLA-G arasında herhangi bir istatistiki ilişki bulunamadı. sHLA-G seviyelerinin grup içinde sigara kullanım miktarı değişkeninden etkilenmiyor olması biyobelirteç olarak kullanılabilirlik değerini arttırmaktadır. Bu özelliğin belirteçlerin kullanılabilirliği için son derece önemli olduğunu düşünüyoruz.

Hasta grubumuz (n=62) içinde yaş, sigara kullanımı ve sHLA-G arasındaki ilişki incelendiğinde sadece yaş ile sigara içiminin arttığını gösteren istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi (P=0,001). Bu ilişki sigaranın yüksek bağımlılık yapıcı özelliği nedeniyle bireylerin yıllar içinde sürekli daha fazla kullanma ihtiyacı sonucu oluşmaktadır. Yine bu grupta da sigara kullanımı ile sHLA-G seviyeleri arasında ilişki bulunamadı. Diğer gruplarda da aynı ilişkinin bulunamaması sHLA-G'nin sigara kullanım miktarından etkilenmediğini kesin olarak kanıtlamaktadır. Bu özellik, hastalarının ve hasta adaylarının büyük çoğunluğu sigara kullanıcısı olan bir hastalıkta sHLA-G'ye biyobelirteç olma yönünde avantaj sağlamaktadır. Grupların oluşturulmasında yaşın guruplar arasında hasta gurubuna göre denk oluşturulduğu göz önüne alındığında ve grupların farklı sHLA-G seviyeleri ortalamalarına sahip



olduğu düşünülürken sHLA-G'nin farklı seviyelerinin yaş ile ilişkisiz olduğu da anlaşılmaktadır. Aynı durum sigara kullanım miktarı değişkeni için de görülebilmektedir. Ayrıca sHLA-G seviyeleri arasındaki farkın sigara kullanmayan ve kullanan kontrol gruplarındaki farkın anlamlı seviyelere ulaşmaması bu bulgumuzu desteklemektedir. Böylece istatistiksel analizlerimizin sonuçlarına göre, gruplar arasındaki sHLA-G seviye farklılığı sadece malignite varlığı ile açıklanabilir. Çalışmamızda hastaların patolojik tanıları ile alt gruplar oluşturularak aralarında sHLA-G seviyeleri yönünden anlamlı fark bulunup bulunmadığını değerlendirmeye çalıştık. Yaptığımız istatistik analizlerde ne hasta grubu small cell ve non-small cell karsinom olarak ayrıldığında ne de tüm alt gruplar (small cell, non-small cell (alt tipi belirlenmemiş), squamose cell, adenocarcinom) incelendiğinde gruplar arasında fark bulamadık. Fakat istatistiksel olarak anlamlı olmasa da small cell karsinomlu hasta grubunda sHLA-G seviyelerinin diğer gruplardan daha yüksek olduğunu tespit ettik. Yine Schütt ve ark (8) yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza zıt olarak sHLA-G seviyelerinin non-small cell karsinom tanı hastalarda small cell karsinom tanı hastalara göre istatistiksel olarak yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamız ile Schütt ve ark (8)'nin çalışması arasında birbirine zıt sonuçlar elde edilmesi Schütt ve ark (8)'nin çalışmasında çalışmaya dahil edilen hastaların tamamının yeni tanı olmamasından ve bir kısmının kemoterapi almış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Schütt ve ark (8) çalışmasında hangi hasta grubundan kaç hastanın hangi süreler ile kemoterapi aldığı bildirilmemiştir. Kemoterapi almış olmanın farklı kanser alt tiplerinin farklı hastalarda farklı seviyelerde yanıt verebilecek olması nedeni ile sHLA-G seviyelerinde de değişikliğe neden olabileceğini düşünüyoruz. Örneğin kemoterapi sonrası small cell karsinomlu bir hastanın tümör boyutu diğer alt tiplere göre daha hızlı bir düşüş gösterebilir ve bu durum sHLA-G seviyelerinde azalmaya neden olabilir. Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz hastaların ise tamamı yeni tanı almış ve hiç kemoterapi almamış bireylerden oluşmaktadır. Bu durumun sHLA-G seviyelerinin hastalığın progresyonu ile de artabileceği göz önüne alınan aynı çalışmada (8) hastalar izlenmiş ve seviyede progresif artış olduğu görülmüştür. Lin ve ark (37) ise non-small cell karsinomlu hastaların alt tipleri arasında sHLA-G seviyeleri bakımından istatistiksel bir farklılık elde edememişlerdir. Biz de

çalışmamızda tanı anındaki sHLA-G seviyelerinin patolojik alt tipler arasında farklılık göstermediğini istatistiksel olarak ortaya koyduk.

Çalışmamızda ayrıca sHLA-G seviyelerinin akciğerde radyolojik olarak tespit edilen görüntüler arasında malign ve benign ayırımında kullanılabilip kullanılamayacağını da araştırdık. Bu amaçla patoloji sonucu benign olan hastalarla malign olan hastaların sHLA-G seviyelerini karşılaştırdık. Analizimiz sonucunda iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka ulaşamadık (tablo 11). Çalışmamız bu yönde akciğer kanseri için yapılmış literatürdeki tek çalışmadır. Benzer şekilde *Zhu ve ark* (36) kolorektal kanserlerinde endoskopi ve kanser cerrahisi yapılan hastaların sHLA-G düzeylerini patoloji sonuçlarına göre değerlendirmişlerdir. Yaptıkları çalışma sonucunda sHLA-G'nin kolorektal kanserler için benign/malign ayırımında kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Ancak çalışmamızın sonuçlarına göre bu durumun akciğer tümörleri için geçerli olmadığını söyleyebiliriz. Bu şekilde bir sonuç elde etmiş olmamız, benign kitlelerde oluşabilecek enflamasyon ile sHLA-G seviyelerinin artmış olmasına bağlanabilir.

Çalışmamızın bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Bunların başında hastaların tamamının evrelemelerinin yapılamamış olması gelmektedir. Merkezimizde onkoloji kliniği yoktur. Bu durumda çalışmaya başlarken araştırmak istediğimiz konulardan olan “sHLA-G seviyelerinin hastalığın farklı evrelerindeki hastalarda değişim gösterip göstermediği” konusunu tam olarak araştıramadık. Evreleme işlemini yapabildiğimiz hastaların (n=27) evreleri ve sHLA-G düzeyleri arasındaki ilişkiyi analiz etmeye çalıştık. Yaptığımız analizler sonucunda ne evre 1/2 olan hastalar ile evre 3/4 olan hastalar arasında ne de evre 1/2/3 olan hastalar ile evre 4 olan hastalar arasında anlamlı sonuca ulaşamadık (sırasıyla p değerleri 0,561 ve 0,383). Benzer değerlendirmeyi 91 nonsmall cell karsinomlu hasta üzerinde yaptıkları çalışmada *Lin ve ark* (37), değerlendirmişler ve evre 4 olarak değerlendirilen hastalar ile evre 1 olarak değerlendirilen hastalar arasında sHLA-G seviyeleri arasında anlamlı farka ulaşmışlardır. sHLA-G için bizim çalışmamıza benzer şekilde evreler arasın farkın olmadığını raporlayan *schütt ve ark* (8) ulaşmışlardır. Üç evreleri karşılaştıramamızın ve benzer bir sonuç elde edememiş olmamızın sebebinin evre değişkeni ile oluşan grupların veri dağılımlarının çok düşük olması olduğunu düşünüyoruz. Bu durumun nedeninin TNM evreleme sistemi ile ilişkili olduğu ve bu evreleme sistemi

kullanılarak aranacak sHLA-G-evre ilişkisinin daha geniş gruplar üzerinde yapılması gerektiği kanısındayız. Ayrıca sHLA-G nin tümör hücrelerinden dolaşıma geçtiği göz önüne alındığında asıl olarak tümör boyutu ve yükü ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. *Ugurel ve ark (27)* melanom hastaları ile yaptıkları çalışmada sHLA-G seviyelerinin belirlenebilen tümör yükü ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. TNM sistemi bizlere tümör boyutu veya yükü değişkenleri için hassas bir ölçü olamamaktadır. Örneğin evresi 4 olan bir hastanın tümör boyutu evresi 1 olan hastadan daha küçük olabilmektedir.

Çalışmamızın bir diğer kısıtlaması ise örnek sayımızın düşüklüğü olmuştur. Bu durum çalışmamızın başında tasarladığımız hasta grubu içinde sigara kullanmayan bireyler ile kullanan bireylerin sHLA-G değerlerini karşılaştırma amacımıza ulaşamamamıza neden olmuştur. Merkezimizin bulunduğu ilin toplam nüfusunun düşük olması (346 493 kişi) ve ülkemizin büyük şehirlerine yakınlığı hastaların dış merkezlere başvurabilmeleri ile bu duruma neden olmuştur. Bazı kısıtlamaları olsa da yapılan bu önemli çalışmanın verileri ışığında sHLA-G'nin tanı amaçlı bir belirteç olarak kullanılabileceğini fakat değerinin daha geniş ve çok merkezli çalışmalarla kesin olarak belirlenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

## 6. SONUÇLAR

Akciğer kanseri diğer birçok kanser gibi tanısı invazif tetkiklerle konulabilen ve toplumda görülen malign hastalıklar arasında en önde bulunan hastalıktır. Hastaların daha erken ve kolay tanı almalarını amaçlayan çalışmalar bulunmaktadır. Biyobelirteçlerin ortaya konması ile ilgili olan çalışmalar aynı zamanda hastalığın ya da progresyonunun patofizyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlamaktadırlar.

Yaptığımız çalışmada asıl olarak akciğer kanseri için sHLA-G isimli klasik olmayan lokosit antijeninin bir biyobelirteç olup olamayacağını araştırdık. Analizlerimiz sonucunda ise sHLA-G'nin bu hastalık için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğine fakat hastalık için benign/malign ayrımı yapamadığı sonucuna vardık. Ayrıca kontrol gruplarımız arasında yaptığımız değerlendirmede sHLA-G seviyelerinin sigara kullanımından etkilenmediğini istatistiksel olarak ortaya koyduk.

Sonuç olarak sHLA-G seviyelerini belirlenmesi akciğer kanseri tanısı kolaylaştırmada kullanılabilecek bir biyobelirteç olarak görünmektedir. Fakat bu belirtecin değeri daha geniş çalışmalarda farklı fizyolojik ve klinik durumlar ile beraber değerlendirilerek kesinleştirilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Anthony JA, Jean GF, and Jonathan MS. Epidemiology of Lung Cancer ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). 2007.
2. Ahmedin J, Freddie B, Melissa M, JacquesFerlay, Elizabeth W, David Forman. Global Cancer Statistics. *Ca cancer J clin* 2011;61:69–90.
3. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2011; 111:4862–4870
4. Urosevic M and Dummer R. Human leukocyte antigen G and cancer immun editing. *Cancer Res* 2008; 68: (3). February 1.
5. Akçam FZ. HLA sistemi. *Türkiye klinikleri J Med Sci*. 2005; 25:829-834
6. Beksaç M. HLA ve doku tiplendirmesi Türk Hematoloji Derneği kan ve kemik iliği transplantasyonu kursu notları (sayfa 42-49) [http://www.thd.org.tr/doc/kurs\\_pdf/hlavedokutiplendirilmesi.pdf](http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/hlavedokutiplendirilmesi.pdf) (Erişim tarihi 26.10.2011)
7. Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B: Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68:417-431
8. Schütt P, Schütt B, Switala M, Bauer S, Stamatis G, Opalka B, Eberhardt W, Schuler M, Horn P, Rebmann V: Prognostic relevance of soluble human leukocyte antigen–G and total human leukocyte antigen clas I molecules in lung cancer patients. *Hum Immunol*. 2010; 71:489-495.
9. Seliger B. Schlaf G. Structure, expression and function of HLA-G in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2007; 17:444-450.
10. Evans C, Dalglish AG, Kumar D. Review article: immune supression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24, 1163-1177.
11. Wiendl H, Mitsdoerffer M , Weller M. Hide-and-seek in the brain: arole for HLA-G mediating immune privilege for glioma cells. *Semin Cancer Biol*. 2003; 13:343-351.

12. Robert LE, Xian PJ, Jeffrey TP, Brian GB, Jonathan FH. Human Leukocyte Antigen G Expression in Breast Cancer: Role in Immunosuppression. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals* .2011 volume 26 number 2 .
13. Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S: Soluble HLA-G are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 2007; 17:469-479.
14. Yie S , Hu Z. Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) as a marker for diagnosis, prognosis and tumor immune escape in human malignancies. *Histol Histopathol*. 2011; 26:409-420.
15. Rajagopalan S, Long EO. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G- specific receptor expressed on all natural killer cells.*JEM*. 1999; 189;7 p1093-1099
16. Navarro, F. Llano, M. Bellon, T. Colonna, M; Geraghty, DE, Lopez-Botet, M. The ILT2 (LIR1) and CD94/NKG2A NK cellreceptors respectively recognize HLA G1 and HLA-E molecules coexpressed on target cells. *Eur. J. Immunol*. 1999, 29 (1), 277–283.
17. Colonna, M. Samaridis, J. Cella, M. Angman, L. Allenm, RL, et al. Cutting edg: human myelomonocytic cells Express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J. Immunol*. 1998, 160 (7), 3096–3100
18. Borrego, F. Ulbrecht, M. Weiss, EH. Coligan, JE. Brooks, AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cellmediated lysis. *J. Exp. Med*. 1998, 187 (5), 813–818.
19. Riteau, B. Menier, C. Khalil-Daher, I. Martinozzi, S. Pla, M. et al. HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition. *Int. Immunol*. 2001, 13 (2), 193–201.
20. Piyush T, and Suraksha A, Non-Classical HLA-G Antigen and Its Role in the Cancer Progression *Cancer Investigation*, 2006; 24:178–186.

21. Le Rond S, Azema C, Krawice-Radanne I, Durrbach A, Guettier C, Carosella ED, et al. Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/regulatory T cells. *J Immunol* 2006;176:3266–76.
22. Menier, C. Riteau, B. Carosella, ED. Rouas-Freiss, N. The MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1- mediated inhibitory signal. *Int. J. Cancer*. 2002, 100 (1), 63–70.
23. Forte, P. Pazmany, L. Matter-Reissmann, UB, Stussi, G. Schneider, MK. Seebach, JD. HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells. *J. Immunol*. 2001, 167 (10), 6002–6008.
24. Dorling, A. Monk, N. Lechler, R. HLA-G inhibits the transendothelial cell migration of human NK cells, a strategy for inhibiting xenograft rejection. *Transplant. Proc*. 2000, 32 (5), 938.
25. Contini P, Ghio M, Poggi A, Filaci G, Indiveri F, Ferrone S, et al. Soluble HLA A,-B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur J Immunol* 2003;33:125–34.
26. Bainbridge, D.R.; Ellis, S.A.; Sargent, I.L. HLA-G suppresses proliferation of CD4(+) T-lymphocytes. *J. Repord. Immunol*. 2000; 48 (1), 17–26.
27. Ugurel S, Rebmann V, Ferrone S, Tilgen W, Grosse-Wilde H, Reinhold U: Soluble human leukocyte antigen—G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon-alpha immunotherapy. *Cancer*. 2001 Jul; 15;92(2):369-76.
28. Lesport E, Baudhuin J, LeMaoult J, Sousa S, Doliger C, Carosella ED, Favier B: Human melanoma cell secreting human leukocyte antigen-G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by impairing lytic granules polarization toward target cell. *Hum Immunol*. 2009; 70(12):1000-5.
29. Gros F, Sebti Y, Guibert S, Branger B, Bernard M, Fauchet R, Amiot L: Soluble HLA-G Molecules Are Increased during Acute Leukemia, Especially in Subtypes Affecting Monocytic and Lymphoid Lineages. *Neoplasia*. 2006; 8:223–230.

30. Urosevic M, Willers J, Mueller B HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood*. 2002; 99:609-617.
31. Erikci AA, Karagoz B, Ozyurt M, Ozturk A, Kilic S, Bilgi O. HLA-G expression in B chronic lymphocytic leukemia: a new prognostic marker? *Hematology*. 2009; 14(2):101-5.
32. Giannopoulos K, Dmoszyńska A, Bojarska-Junak A, Schmitt M, Roliński J. Expression of HLA-G in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46(4):457-60.
33. Sebti Y, Le Friec G, Pangault C, Gros F, Drénou B, Guilloux V, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Amiot L. Soluble HLA-G molecules are increased in lymphoproliferative disorders. *Hum Immunol*. 2003; 64(11):1093-101.
34. Chen H , Lin A, Shen C. Upregulation of human leukocyte antigen–G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. *Hum Immunol*. 2010; 71:892–898.
35. D. Sayed, G. Badr, D. Maximous. HLA-G and its relation to proliferation index in and monitoring breast cancer patients. *Tissue Antigens*.2010;75: 40–47.
36. Zhu C, Wang C, Zhang X. Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. *Int. J. Cancer*. 2011; 128: 617–622.
37. Lin A, Zhu CC, Chen HX, Chen BF, Zhang X, Zhang JG, Wang Q, Zhou WJ, Hu W, Yang HH, Xu HH, Yan WH .Clinical relevance and functional implications for human leucocyte antigen-g expression in non-small-cell lung cancer. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(9):2318-29.
38. Yılmaz HH, Yazihan N, Tunca D,Sevinc A, Olcayto EO, Özgül N and Tuncer M. Cancer Trends and Incidence and Mortality Patterns in Turkey. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41(1)10 – 16.



39. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends including cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1672-1694 .
40. Wald NJ, Nanchahal K, Thompson SG. Does breathing other people's smoke cause lung cancer? *BMJ* 1986;293:1217-1222.
41. Cao M, Yie S-M, Liu J, Ye S.R, Xia D, Gao E. Plasma soluble HLA-G is a potential biomarker for diagnosis of colorectal, gastric, esophageal and lung cancer. *Tissue antigens* 2011;78,120-128.
42. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al . Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3:991-8.
43. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al . Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997; 18: 89-95.
44. Romero P, Valmori D, Pittet MJ et al . Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev.* 2002; 188: 81-96.
45. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003; 90: 127-56.
46. Redondo M, Ruiz-Cabello F, Concha A et al . Altered HLA class I expression in non-small cell lung cancer is independent of c-myc activation. *Cancer Res.* 1991; 51: 2463-8.
47. Kikuchi E, Yamazaki K, Torigoe T et al . HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2007; 98: 1424-30.
48. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F et al . Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer.* 1996; 73: 148-53.
49. Ramnath N, Tan D, Li Q et al . Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55: 891-9.

50. Chang CC, Campoli M, Ferrone S. HLA class I antigen expression in malignant cells: why does it not always correlate with CTL-mediated lysis *Curr Opin Immunol.* 2004; 16: 644–50.
51. Tripathi P, Agrawal S. Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Invest.* 2006; 24: 178–86.
52. Özlü, Metintaş, Karadağ, Kaya. Solunum sistemi ve hastalıkları sf 1325. İstanbul tıp kitapevi 2010.
- Poláková K, Železníková T, Russ G. HLA-G5 in the blood of leukemia patients and healthy individuals. *Leuk Res.* 2013 Feb;37(2):139-45.
53. Poláková K, Železníková T, Russ G. HLA-G5 in the blood of leukemia patients and healthy individuals. *Leuk Res.* 2013 Feb;37(2):139-45.

## **EKLER**

1. Etik kurul belgesi