T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEAP-1/NRF2 YOLAĞININ KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDEKİ ROLÜ

Sena ÖKMEN

ORCID: 0000-0002-0244-257X

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
EYLÜL 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2019970076

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEAP-1/NRF2 YOLAĞININ KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDEKİ ROLÜ

Sena ÖKMEN
ORCID: 0000-0002-0244-257X

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI

Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Gökçen Ömeroğlu Şimşek

ORCID: 0000-0002-2724-0616

İkinci Danışman: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

ORCID: 0000-0002-7658-5565

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından TYL-2022-2756 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
EYLÜL 2023

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "KEAP-1/NRF2 Yolağının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserindeki Rolü" başlıklı Yüksek Lisans tezim için elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını , aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Öğrencinin Adı Soyadı: Sena ÖKMEN

Tarih: 08.08.2023

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı'na yüksek lisans yapmak amacıyla geldiğim ilk günden itibaren bölümde akademik gelişimim için bana her türlü imkanı sağlayan; maddi, manevi ve bilimsel anlamda desteğini her zaman hissettiğim ve kendisinden çok kıymetli bilgiler öğrendiğim Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı sevgili Prof. Dr. Safiye Aktaş hocama, tezimin gelişiminde çok katkısı olan ve birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım danışman hocam Gökçen Ömeroğlu Şimşek'e, derslerine girdiğim ve gelişimime katkı sağlayan tüm diğer hocalarıma,

Birlikte kıymetli çalışmalar yaptığımız, yüksek lisans eğitimimin her aşamasında desteklerini benden esirgemeyen ve tezimin olgunlaşmasına çok katkısı olan sevgili arkadaşlarım Burçin BARAN, Gamze SANLAV ve Merve TÜTÜNCÜ'ye,

Yüksek lisans yapmaya karar verdiğimde henüz fikir aşamasındayken bile beni destekleyen, bütün düzenimizi bana göre yeniden şekillendiren, stresli zamanlarımda beni motive eden ve başarılarımla en az benim kadar gurur duyan biricik eşim Hasan ÖKMEN'e,

Eğitim ve Öğretim hayatım boyunca arkamda duran ve beni koşulsuzca destekleyen annem Hatice EKMEN ve babam Tacettin EKMEN'e, maddi manevi destekleri ile kendimi çok şanslı hissettiren amcalarım Mehmet Ali EKMEN ve Hasan EKMEN'e, tüm aileme en derin teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ ..... **i**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iv**

ÖZET ..... **v**

ABSTRACT ..... **vi**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi 1

1.2. Araştırmanın Amacı 3

1.3. Araştırmanın Soru ve Hipotezleri 3

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1 Akciğer Kanseri 4

2.1.1. Akciğer Kanseri Etiyolojisi 4

2.1.2 Genetik Faktörler 6

2.1.3 Beslenme 7

2.1.4 Cinsiyet 7

2.1.5 Yaş 8

2.1.6 Akciğer Kanseri Evrelemesi 9

2.1.7 Akciğer Kanseri Sınıflaması 9

2.1.8 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri 9

2.1.9 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri 10

2.2 Akciğer Kanseri İle İlişkili Genler ve Mutasyonlar 11

2.2.1. Keap1-Nrf2 Yolağı 12

2.2.2. Akciğer Kanserinde Nrf2'nin İkili Rolü 15

2.2.3. KHDAK'nde Nrf2'nin İyi Tarafı 15

2.2.4. KHDAK İlerlemesinde Nrf2'nin Kötü Tarafı 16

3. GEREÇ VE YÖNTEM 17

3.1. Araştırmanın Tipi 17

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı 17

3.3. Çalışma Materyali 18

3.4. Araştırmanın Değişkeni 18

3.5. Kullanılan Malzemeler 18

3.6. Kullanılan Metotlar 18

3.7 İstatistik Değerlendirme: 21

3.8 Araştırmanın Sınırlılıkları: 21

3.9 Etik Kurul Onayı 21

4. BULGULAR 22

4.1 İHK Boyama Sonuçları 24

4.2 Eş-zamanlı PCR Sonuçları 32

5. TARTIŞMA 39

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 41

7. KAYNAKLAR 42

8. EKLER 48

EK.1 Katkı 48

EK.2 Etik Kurul Raporu 49

EK. 3 Özgeçmiş 51

TABLO DİZİNİ

Tablo1 Risk faktörleri ve akciğer kanserine etkisi 6

Tablo.2 Hastaların genel özellikleri: yaş, cinsiyet evre sigara kullanımı ve patolojik bulgularını gösterilmiştir. 23

Tablo.3 Hastaların sağ kalım bilgileri: sağ kalım, genel sağ kalım ve hastalıksız sağkalım bilgileri verilmiştir. 24

Tablo.4 Tümör ve Normal dokuların IHK yöntemi ile Nrf2 ve Keap1 protein ekspresyon sonuçlarını göstermektedir. 25

Tablo 5 Korelasyon Analizi ile Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinik özellikleri arasında ilişki olup olmadığı incelenmiştir 38

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Akciğer Kanseri Çeşitleri 10

Şekil 2. Nrf2 ve Keap1 proteinlerinin yapısı 13

Şekil 3: Nrf2/Keap1 Yolağı: Kanonik ve Kanonik Olmayan Yolak 15

Şekil 4. KHDAK Gelişiminde Nrf2'nin rolü 16

Şekil 5. Nano PCR Cihazında Kullanılan Arayüz..... 20

Şekil.6 IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların sağlıklı dokusunun Nrf2 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır) 25

Şekil 7. IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların tümör dokusunun Nrf2 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır) ..26

Şekil 8. IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların normal dokusunun Keap1 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır) .26

Şekil 9 IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların tümör dokusunun Keap1 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır).27

Şekil 10 Akciğer kanseri hastası normal doku örneklerinde Nrf2 protein ekspresyon düzeyinin hastalardaki genel sağ kalıma etkisi. Yüksek Nrf2 ekspresyonu gösteren hastaların anlamlı bir şekilde düşük sağ kalıma sahiptir (p=0.031)..... 28

Şekil 11. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Nrf2 protein ekspresyonu incelenmiştir. Nrf2 ekspresyonu gösteren hastaların olaysız sağkalımlarının anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır 29

Şekil 12. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Nrf2 protein ekspresyonu hastaların sağkalımıyla ters orantılı bir ilişki göstermektedir 30

Şekil 13. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Keap1 protein ekspresyon düzeyi ile hastaların genel sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir..... 31

Şekil 14. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Keap1 protein ekspresyon düzeyi ile hastaların olaysız sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir 32
Şekil 15 Akciğer kanseri hastalarında adenokarsinom ve sküamoz hücreli karsinom örneklerinde KEAP1 gen ekspresyon düzeyleri 33
Şekil 16 Akciğer kanseri hastalarında adenokarsinom ve sküamoz hücreli karsinom örneklerinde NRF2 gen ekspresyon düzeyleri 34
Şekil 17. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde NRF2 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların genel sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir 35
Şekil 18. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde NRF2 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların olaysız sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir 35
Şekil 19. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde KEAP1 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların genel sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. 36
Şekil 20. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde KEAP1 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların olaysız sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir. 37

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALK: Anaplastik Lenfoma Kinaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

ESMO: Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği

HAA: Heterosiklik aromatik aminler

İHK: İmmünohistokimya

Keap1: Kelch benzeri ECH bağlayıcı protein 1

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KRAS: Kirsten Rat Sarcoma

Nrf2: Nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör-2

PAH: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RB: Retinoblastoma

ROS: Reaktif oksijen türleri

TKI: Tirozin kinaz inhibitörü

TP53: Tümör protein 53

TNM: Tümör, Nod, Metastaz

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

KEAP-1/NRF2 YOLAĞININ KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDEKİ ROLÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Sena ÖKMEN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Akciğer kanseri, yılda ortalama 1,6 milyon ölümle dünya çapında kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tüm akciğer kanseri vakalarının %85'ini oluşturur. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinin en yaygın alt tipleri adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomdur.

Akciğerler sürekli olarak lipitlere, proteinlere, oksidatif strese neden olan kimyasallara ve kanserojenlere maruz kalır. Buna karşılık, akciğer hücreleri kendilerini bu hasara karşı korumak için sitoprotektif mekanizmalara girerler. Akciğer hücrelerinde, Kelch benzeri ECH bağlayıcı protein 1 (Keap1)-nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör-2 (Nrf2) yolu, oksidatif stresle başa çıkmada esastır. Çevresel veya dahili hasara yanıt olarak, Keap1-Nrf2 yolu, hücreleri oksidatif strese karşı koruyan ve hücre hayatta kalmasını destekleyen birçok sitoprotektif/savunma proteininin ekspresyonunu arttırır. Akciğer kanseri örneklerinde Keap1/Nrf2 yolu mutasyonlarının tümör ilerlemesi, kemoterapötik ilaçlara direnç ve kötü prognoz ile bu örneklerde yüksek Nrf2 ve Keap1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan KHDAK patolojik tanısı almış doku örnekleri kullanılmış; Keap1/Nrf2 yolağının gen ve protein ifadeleri, adenokarsinomlu ve skuamöz hücreli karsinomalı 48 hastanın dokularında kantitatif eşzamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve immünohistokimyasal (IHK) boyama yöntemleri ile değerlendirildi ve elde edilen verilerin istatistiksel analizi yapıldı. Gerçekleştirilen Q-PCR sonuçlarına göre adenokarsinom hastalarında yüksek KEAP1 gen ekspresyonu gözlenirken, skuamöz hücreli karsinom hastalarında KEAP1 gen ekspresyonu daha düşük bulundu. Her iki hasta tipinde yüksek NRF2 gen ekspresyonu gözlenmiştir. NRF2 gen ekspresyonu yüksek evreli akciğer kanseri hastalarında daha yüksek bulundu. KEAP1 ve NRF2 gen ekspresyon seviyeleri ile hasta sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi. IHK sonuçlarında, yüksek Nrf2 protein ekspresyonu olan hastaların genel ve olaysız sağ kalımı anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Aynı hastalarda Keap1 ekspresyonu ile hasta sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, Keap1, Nrf2, sağ kalım, gen ekspresyonu, protein ekspresyonu

Tez sayfa adedi:65

Danışman: Dr .Öğr. Üyesi Gökçen Ömeroğlu Şimsek

THE ROLE OF KEAP-1/NRF2 PATHWAY IN NON SMALL CELL LUNG CANCER

Master Thesis

Sena ÖKMEN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Basic Oncology

ABSTRACT

Lung cancer is the most common cause of cancer-related death worldwide, with an average of 1.6 million deaths yearly. Non-small cell lung cancer accounts for 85% of all lung cancer cases. The most common subtypes of non-small cell lung cancer are adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

The lungs are constantly exposed to lipids, proteins, chemicals that cause oxidative stress, and carcinogens. In turn, lung cells engage cytoprotective mechanisms to protect themselves against this damage. In lung cells, the Kelch-like ECH binding protein 1 (Keap1)-nuclear factor erythroid-2-related factor-2 (Nrf2) pathway is essential in coping with oxidative stress. In response to environmental or internal damage, the Keap1-Nrf2 pathway increases the expression of many cytoprotective/defense proteins that protect cells against oxidative stress and promote cell survival. In lung cancer samples, it has been determined that the Keap1/Nrf2 pathway mutations are associated with tumor progression, resistance to chemotherapeutic drugs and poor prognosis, and high Nrf2 and Keap1 expression in these samples.

In our thesis study, tissue samples with pathological diagnosis of NSCLC found in the archive of Dokuz Eylül University Department of Basic Oncology were used; The gene and protein expressions of the Keap1 / Nrf2 pathway were evaluated by quantitative simultaneous polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemical (IHC) staining methods in the tissues of 48 patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, and statistical analysis of the obtained data was performed. According to the Q-PCR results, high KEAP1 gene expression was observed in adenocarcinoma patients, while KEAP1 gene expression was lower in squamous cell carcinoma patients. High NRF2 gene expression was observed in both types of patients. NRF2 gene expression was found to be higher in high-stage patients. No significant correlation was observed between KEAP1 and NRF2 gene expression levels and patient survival. According to the results of IHC, the overall and event-free survival of patients with high Nrf2 protein expression was significantly lower. No significant correlation was found between Keap1 protein expression and patient survival in the same patients.

Keywords: Lung cancer, Keap1, Nrf2, survival, gene expression, protein expression

Page number:65

Advisor:.Prof. Dr. Gökçen Ömeroğlu Şimsek

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Dünya çapında kanserle ilişkili mortalitenin en yaygın nedeni; her yıl tahmini 1,6 milyon ölüm ile akciğer kanseridir ve en sık görülen alt tipler olan adenokarsinom ile skuamöz hücreli karsinomun da aralarında bulunduğu küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), teşhis edilen tüm diğer akciğer kanseri vakalarının %85'ini oluşturmaktadır (1,2,3). Akciğer kanserinin kadın tümörlerinde insidans oranı %14,32 iken, erkeklerde görülen tümörlerin %22,83'ünü oluşturur ve her iki cinsiyet için de en fazla ölüme sebep olan kanserdir. Akciğer kanserinin 5 yıllık genel sağ kalım oranı %15'den azdır. Evre I akciğer kanseri olan hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %60-90 iken, evre IIIb ve evre IV olan hastalarda sadece %5-20'dir. Çoğu akciğer kanseri, etkili tanı yöntemlerinin olmaması nedeniyle orta ve geç evrelerde tespit edilir. Bu nedenle, akciğer kanserinin erken teşhisi ve tedavisi mortalitesini kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır (4,5,6).

Her ne kadar hedefe yönelik tedavi KHDAK hastalarında kemoterapiye yanıtı güçlendirse de Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) Klinik Uygulama Klavuzu'nda bilinmeyen mutasyon durumu ya da belirli mutasyonu olmayan KHDAK hastaları için platinyum temelli tedaviler standart terapi olarak kabul edilmektedir. Ancak opere edilemeyen KHDAK için tedavi genellikle palyatiftir. Akciğer kanserinde kemoterapinin başarısızlığının arkasındaki en büyük etken ilaç direncidir.

Akciğer sürekli olarak lipidlere, proteinlere ve DNA'ya oksidatif strese neden olan kimyasallara ve kanserojenlere maruz kalır. Buna karşılık, akciğer hücreleri kendilerini bu hasarlara karşı korumak için sitoprotektif mekanizmaları aktive etmelidir(7). Akciğer kanseri tümörleri, oksidatif strese neden olan hasarlara veya tümör büyümesinin mikroçevre koşullarında üretilen ksenobiyotiklerin toksisitesine karşı koruma sağlayan bu yeteneği miras almaktadır (8). Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1)-nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör-2 (Nrf2) yolu, oksidatif stresle başa çıkmada hücreler için önemli bir belirleyicidir (9). Çevresel veya endojen hasarlara yanıt olarak, Keap1-Nrf2 yolu, hücreleri oksidatif strese karşı koruyan ve hücre sağ kalımını teşvik eden bir dizi sitoprotektif/savunma proteininin ekspresyonunu arttırır (10).

Önceki veriler, akciğer kanserinde Keap1-Nrf2 yolunun anormal durumlarının bulunduğunu göstermektedir (11,12,13). Akciğer kanserinde yüksek Nrf2 Seviyeleri ve Keap1 disfonksiyonu sıklıkla tespit edilmiştir ve tümör ilerlemesi, sitoproteksiyon, kemoterapötik ilaçlara direnç ve kötü prognoz ile ilişkili olması mümkündür (14).

KEAP1-NRF2 mutasyonel durumunun KHDAK için kötü prognoz ve kemoterapötik direnç ile ilişkili olduğunu gösteren artan veriler vardır (11). Örneğin, Inoue ve arkadaşları, 109 KHDAK vakasından klinik doku örneklerinde immünohistokimyasal analizlerle Nrf2 ekspresyonunu incelediler ve Nrf2'nin daha yüksek nükleer birikiminin daha kötü akciğer kanserine özgü sağ kalım ile ilişkili olduğunu gözlemlediler (15). İmmünohistokimya ile Yang ve arkadaşları, evre IIIB veya IV KHDAK olan 60 hastanın Nrf2 ekspresyon durumunu analiz ettiler ve her iki grupta da platin bazlı tedavilere yanıtı karşılaştırdılar. Hemen hemen tüm vakalarda nrf2 için pozitif boyama farklı derecelerde bulunsada, evre IV hastalığı olan hastalar evre IIIB hastalığı olan hastalara göre daha yüksek Nrf2 ekspresyonu sergiledi (P=0.017). İlginç bir şekilde, <%75 pozitif boyaması olan hastalar, %75-100 pozitif boyaması olanlara göre daha yüksek bir yanıt oranı elde ettiler (P=0.003; r=0.447) ve bu durum nrf2 ekspresyonunun platin bazlı tedavilerin etkinliğini tahmin etmek için yararlı bir endeks olabileceğini düşündürmektedir (16).

İlginç bir şekilde, çeşitli KHDAK tümör örnekleri ile yapılan çalışmaların sonuçları, NRF2 veya KEAP1 mutasyonunun oluşumunun birbiri ile alakasız iken farklı histolojilerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Solis ve ark. (17), adjuvan tedaviyi takiben 304 tümör dokusu örneğini (190 adenokarsinom ve 114 skuamöz hücreli karsinom) incelediler. KHDAK örneklerinin %26'sında nükleer Nrf2 ekspresyonunun skuamöz hücreli karsinomda (%38) adenokarsinomdan (%18; P<0.0001) önemli ölçüde daha yaygın olduğunu tespit ettiler ve nükleer Nrf2 bolluğu ile daha kötü progresyonsuz sağkalım ilişkisi kurdular. Li ve arkadaşları (18), papiller adenokarsinom tümörlerinde Keap1 değişikliklerinin sıklığının (% 60), daha önce KHDAK için bildirilenden anlamlı olarak (% 3-19) daha yüksek olduğunu bildirmiştir (19). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Frank ve arkadaşları (20), KHDAK'li 1.391 hastanın tümör dokularını analiz etti ve Nrf2 mutasyonlarının sıklığının% 3.5 (n = 49) olduğunu, Keap1 mutasyonlarının ise% 11.3 (n = 157) olduğunu tespit etti.

Son yıllarda ilaç şirketleri, Keap1-Nrf2 etkileşimini engelleyebilen yeni ve etkili molekülleri tanımlamak için Keap1-Nrf2 yolağı hedeflerine odaklandılar. Keap1 veya Nrf2

moleküllerini hedeflemenin açık bir avantajı, standart antitümör kemoterapilerinin etkinliğinde beklenen artış olacaktır ve çeşitli kemoterapi ilaçlarının detoksifikasyonunda yer alan detoksifikasyon yolaklarının hedeflenmesi, alternatif veya yedek detoksifikasyon yolağı aktivasyonu olasılığını azaltmak için de gerekli olacaktır.

Son zamanlarda, Nrf2 inhibisyonu, Nrf2'nin aşırı aktivasyonunu gösteren kanserler için umut verici bir terapötik yaklaşım haline gelmiştir ve sonuç olarak, Keap1/ Nrf2 yolu deregülasyonu olan NSCLC hastalarında Nrf2 inhibitörlerinin klinik uygulaması yararlı bir terapötik strateji olabilir (21).

1.2. Araştırmanın Amacı

Önceki veriler, akciğer kanserinde Keap1-Nrf2 yolağının anormal durumlarının bulunduğunu göstermektedir. Akciğer kanserinde yüksek Nrf2 Seviyeleri ve Keap1 disfonksiyonu sıklıkla tespit edilmiştir ve tümör ilerlemesi, sitoproteksiyon, kemoterapötik ilaçlara direnç ve kötü prognoz ile ilişkili olması mümkündür. Fakat literatürde, Keap1/Nrf2 yolağının disfonksiyonun özellikle erken evre KHDAK vakalarında hastalığı belirleyici bir biyomarker olabileceği ile ilgili sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Planlanan bu çalışmada amacımız, adenokarsinom ve squamöz hücreli karsinom hastalarında Keap1/Nrf2 yolağının ekspresyon düzeyini gözlemleyerek, bu yolak ekspresyonunun erken evre KHDAK vakalarında aday biyobelirteç olup olamayacağını araştırmaktır. Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan KHDAK patolojik tanısı konulmuş doku örnekleri kullanılacak olup; real time PCR yöntemi ile KEAP-1/NRF2 gen ekspresyonu, immünohistokimya yöntemi ile Keap1/Nrf2 protein ekspresyonları değerlendirilecek ve elde edilen veriler ile istatistiksel analiz yapılacaktır.

1.3. Araştırmanın Soru ve Hipotezleri

KHDAK hastalarını erken evrede tespit edebilmek, hastalığın mortalitesini kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın amacı, seçilen adekarsinom ve squamöz hücreli karsinom vakalarında Keap1/Nrf2 ekspresyonunu tespit ederek bu yolağın KHDAK erken evre tanısında bir biyobelirteç olup olamayacağını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Akciğer Kanseri

Dünya çapında kanserle ilişkili mortalitenin en yaygın nedeni; her yıl tahmini 1.6 milyon ölüm ile akciğer kanseridir ve en sık görülen alt tipler olan adenokarsinom ile skuamöz hücreli karsinomun da aralarında bulunduğu küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), teşhis edilen tüm diğer akciğer kanseri vakalarının %85'ini oluşturmaktadır (1,2,3). Akciğer kanserinin kadın tümörlerinde insidans oranı %14.32 iken, erkeklerde görülen tümörlerin %22.83'ünü oluşturur ve her iki cinsiyet için de en fazla ölüme sebep olan kanserdir. Akciğer kanserinin 5 yıllık genel sağ kalım oranı %15'den azdır. Evre I akciğer kanseri olan hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %60-90 iken, evre IIIb ve evre IV olan hastalarda sadece %5-20'dir. Çoğu akciğer kanseri, etkili tanı yöntemlerinin olmaması ve başlangıçta halsizlik, öksürük gibi spesifik olmayan semptomlar verdiğinden orta ve geç evrelerde tespit edilir. Hastaların ancak %10'una erken evrede teşhis konulabilir. Hastaların çoğuna genelde evre lll ve lV'te tanı konulabilmesi nedeniyle 5 yıllık sağkalımı %5'in altında seyretmektedir (4). Tanı konulmuş hastaların tamamı değerlendirildiğinde ise ortalama sağkalım 1 yıl bulunmuştur (1). Bu nedenle, akciğer kanserinin erken teşhisi ve tedavisi mortalitesini kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır (4,5,6).

2.1.1. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Sigara kullanımı; akciğer kanserinin en belirgin ve güçlü etiyolojik faktörüdür. Sigara içimiyle artan akciğer kanseri riski arasındaki ilişki birçok epidemiyolojik çalışma ile gösterilmiştir (22,23). Sigara dumanında yer alan karsinojenik maddeler, akciğer hücrelerine zarar vererek DNA hasarına ve genetik mutasyonlara neden olur (24). Sigara dumanında bulunan başlıca karsinojenler arasında benzoapiren, nitrozaminler, benzene, formaldehit ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) bulunur (25). Bu maddeler akciğer dokusunda genetik değişikliklere ve kanser gelişimine yol açan hücresel hasara neden olurlar (26). Bir meta-analiz çalışması, sigara içenlerin akciğer kanseri geliştirme riskinin, sigara içmeyenlere kıyasla 20 ila 30 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur . Aynı çalışma, sigara içenlerin yaşam boyu akciğer kanseri geliştirme riskinin erkeklerde %23, kadınlarda ise %13 olduğunu göstermiştir (27) .

Sigara içimi ne kadar uzun süre ve ne kadar yoğun olduğu da akciğer kanseri riskini etkiler. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, günde bir paket sigara içenlerin akciğer kanseri riskinin, yarım paket içenlere kıyasla 25 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (28) Sigarayı bırakmak, akciğer kanseri riskini azaltmanın önemli bir yolu olarak kabul edilir. Örneğin, sigarayı bırakan bir kişinin akciğer kanseri riski, sigara içmeye devam eden bir kişiye göre zaman içinde azalmaya başlar. Bir çalışma, 50 yaşında sigarayı bırakan bir kişinin, 10 yıl sonra sigarayı bırakmayan bir kişiye göre akciğer kanseri geliştirme riskinin yarı yarıya azaldığını göstermiştir (29).

Mesleki karsinojenler, çalışma ortamlarında maruz kalınan kimyasal ve fiziksel ajanlar olarak tanımlanır ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin gelişiminde önemli bir rol oynayabilir (Tablo 1). Sigara kullanımından başka akciğer kanserlerinin %9-15'inden mesleki karsinojen maruziyeti, radon %10 ve hava kirliliği ise %1-2'sinden sorumludur. Asbest gibi mineral lifler, metal dumanları, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar), nikel, krom, arsenik ve radon gibi maddeler akciğer kanserine neden olabilen önemli mesleki karsinojenler arasında yer alır (30,31,32) Epidemiyolojik çalışmalar, mesleki maruziyetin akciğer kanseri insidansıyla güçlü bir ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bir meta-analiz çalışması, mesleki asbest maruziyetinin akciğer kanseri riskini 4 ila 7 kat artırdığını bulmuştur (33). Benzer şekilde, metal dumanlarına maruz kalan işçilerde akciğer kanseri riskinin arttığı da gözlemlenmiştir (34).

Tablo1. Risk faktörleri ve akciğer kanserine etkisi

RİSK FAKTÖRÜ	AKCİĞER KANSERİNE ETKİSİ
Sigara Kullanımı	Sigara kullanmayanlara göre 20 kat daha yüksek risk
Pasif İçicilik	Hiç sigara içmeyenlere kıyasla %25 ila %28 daha yüksek risk
Elektronik Sigara	Etkileri henüz bilinmiyor
Diğer Tütün Kullanımları	1,9 ila 4,6 kat artan risk
Radon	%14 ila %29 artan risk
Asbest	%12 ila %24 artan risk
KOAH Öyküsü	2 ila 3 kat artan risk
Astım Öyküsü	%28 ila %44 artan risk
Tüberküloz Öyküsü	%48 ila %76 artan risk
HIV	2 kat artan risk

2.1.2 Genetik Faktörler

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Mutasyonları: Akciğer kanserinde en yaygın görülen genetik mutasyonlardan biri EGFR mutasyonlarıdır. EGFR mutasyonları, non-small cell lung cancer (NSCLC) hastalarının yaklaşık %10 ila %15'inde görülür. EGFR mutasyonları, Asyalı olmayan ve sigara içmeyen hastalarda daha sık görülme eğilimindedir. EGFR mutasyonlarına sahip olan hastaların EGFR inhibitörleri ile tedavi edilmesi, daha iyi klinik yanıtlar elde etme olasılığını artırır (35,36)

Kirsten Rat Sarcoma Virüsü (KRAS) Mutasyonları: KRAS mutasyonları, akciğer kanserinin en sık görülen genetik değişikliklerindendir. NSCLC hastalarının yaklaşık %25 ila %30'u KRAS mutasyonlarına sahiptir. KRAS mutasyonları, genellikle sigara içen ve adenokarsinoma histolojisi olan hastalarda daha yaygındır. KRAS mutasyonu olan hastalar genellikle kötü bir prognoza sahip olup, hedefe yönelik tedavilerde sınırlı yanıt verme eğilimindedir (37,38)

Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) Füzyonları: ALK füzyonları, NSCLC hastalarının yaklaşık %3 ila %7'sinde görülür. ALK füzyonları genellikle genç, hafif veya hiç sigara

içmeyen hastalarda daha sık görülür. ALK füzyonlarına sahip olan hastalarda, ALK inhibitörleri ile tedavi edilmesi, daha iyi klinik yanıtlar elde etme olasılığını artırır. (39,40)

RET Füzyonları: RET (Rearranged during transfection) füzyonları, akciğer kanserinin nadir görülen genetik mutasyonlarındandır. RET füzyonları yaklaşık %1 ila %2 oranında görülür. RET füzyonları, genellikle genç yaşta, hafif veya hiç sigara içmeyen hastalarda daha sık gözlenir. RET inhibitörleri ile tedavi, RET füzyonlarına sahip hastalarda tercih edilen bir seçenektir (41,42)

2.1.3 Beslenme

Epidemiolojik çalışmalar, bazı besinlerin tüketimi ve akciğer kanseri riski arasında ilişki olduğunu göstermiştir. Örneğin, bir meta-analiz çalışması, yüksek miktarda meyve ve sebze tüketiminin akciğer kanseri riskini azalttığını ortaya koymuştur .Bu çalışma, düşük meyve ve sebze tüketiminin akciğer kanseri riskini artırdığını da göstermiştir (43).

Antioksidanlar, akciğer kanseri riskini azaltmada önemli bir rol oynar. Örneğin, C vitamini, E vitamini ve beta-karoten gibi antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerini nötralize ederek kanser gelişimini engelleyebilir. Bir çalışma, beta-karoten takviyesinin akciğer kanseri riskini sigara içenlerde azalttığını göstermiştir (44).

Heterosiklik aromatik aminler (HAA'lar) gibi kanserojen maddelerin oluşumunu azaltmak için besin hazırlama yöntemleri önemlidir. Yüksek sıcaklıkta kızartma, ızgara veya fırınlama gibi yöntemler, HAA'ların oluşumunu artırabilir (45).

2.1.4 Cinsiyet

Akciğer kanseri, erkeklerde ve kadınlarda farklı prevalans gösterir. Birçok epidemiyolojik çalışma, erkeklerde akciğer kanserinin daha sık görüldüğünü göstermektedir. Örneğin, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sağlanan verilere göre, 2020 yılında dünya genelinde akciğer kanseri insidansı erkeklerde 27.1/100.000 iken, kadınlarda 17.9/100.000 olarak rapor edilmiştir (46).

Sigara içenler arasında akciğer kanseri insidansı, cinsiyet arasında farklılık gösterebilir. Örneğin, bir meta-analiz çalışması, erkeklerde sigara içimiyle akciğer kanseri arasındaki ilişkinin daha güçlü olduğunu bulmuştur.Bu çalışma, erkeklerin sigara içmeye bağlı olarak

kadınlara kıyasla daha yüksek akciğer kanseri riskine sahip olduğunu göstermiştir (47).Sigara içmeyenler arasında da cinsiyetle ilgili farklılıklar olabilir. Kadınların sigara içmeyenler arasında bile akciğer kanseri riskinin erkeklere kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Akciğer kanseriyle ilişkili olan bazı genetik mutasyonlar, cinsiyetle de ilişkili olabilir. Örneğin, EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) mutasyonları, kadınlarda daha sık görülürken, KRAS mutasyonları ise erkeklerde daha sık görülebilir (48,49). Hormonal faktörlerin de akciğer kanseri riskinde rol oynadığı düşünülmektedir. Östrojen reseptörlerinin akciğer dokusunda bulunması ve östrojenin bazı tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebilme özelliği, cinsiyet hormonlarının akciğer kanseri riski üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir (50).

2.1.5 Yaş

Epidemiyolojik çalışmalar, akciğer kanserinin ilerleyen yaşla birlikte artan bir sıklıkla görüldüğünü göstermektedir. Özellikle 65 yaş ve üzeri yaş gruplarında akciğer kanseri insidansı belirgin bir şekilde yükselir. Bunun birkaç nedeni vardır:

Sigara içimi, akciğer kanseri riskini artıran en önemli etkenlerden biridir. Sigara içen bireylerde akciğer kanseri riski, içmeyenlere göre çok daha yüksektir. İleri yaşlarda, genellikle daha uzun süre ve daha yoğun şekilde sigara içilmiş olması nedeniyle akciğer kanseri riski artar (51).

İleri yaşlarda, bireyler genellikle uzun bir süre boyunca çeşitli çevresel faktörlere maruz kalmış olurlar. Bu faktörler arasında endüstriyel kimyasallar, ev içi hava kirliliği, radon gazı gibi çevresel kirleticiler ve asbest gibi mesleki maruziyetler bulunabilir. Bu uzun süreli maruziyetler, akciğer kanseri riskini artırabilir (52).

Bir çalışma, 65 yaş ve üstü kişilerde akciğer kanseri insidansının genç yaş gruplarına göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada, 65-74 yaş grubunda akciğer kanseri insidansı 100.000 kişi başına 264,7 olarak bulunmuştur, 75-84 yaş grubunda 100.000 kişi başına 384,6 ve 85 yaş ve üstü grubunda 100.000 kişi başına 378,7 olarak tespit edilmiştir (53).

2.1.6 Akciğer Kanseri Evrelemesi

Akciğer kanseri evreleme sistemi, kanserin ilerlemesini ve yayılmasını belirlemek için kullanılan standart bir sınıflandırma sistemidir. Evreleme, kanserin tümör boyutu, lenf nodu tutulumu ve uzak metastaz gibi faktörlerin değerlendirilmesini içerir. Genellikle TNM (Tumor, Node, Metastasis) sınıflandırma sistemi, kanserin bu temel özelliklerini kodlayarak evrelendirme yapar.

TNM evreleme sistemi, kanserin tümör boyutunu (T), lenf nodu tutulumunu (N) ve uzak metastaz varlığını (M) belirtmek için kullanır. T kategorisi, tümörün boyutunu ve yerini belirler. N kategorisi, lenf nodu tutulumunun varlığını ve yayılımını değerlendirir. M kategorisi ise uzak organ metastazının varlığını belirler. Bu kategoriler, rakam ve harf kombinasyonlarıyla ifade edilerek kanserin evresini belirlemek için birlikte kullanılır.

Akciğer kanseri evreleme sistemi, genellikle 0'dan IV'e kadar olan evrelerle ifade edilir. Evre 0, kanserin henüz yerel alanda sınırlı olduğunu ve yayılmadığını ifade ederken, evre IV ise kanserin uzak organlara yayıldığını ve metastaz yaptığını gösterir. Evre I, tümörün sınırlı bir bölgeye yayıldığını, evre II ise tümörün yerel alanda genişlediğini ve lenf nodu tutulumu olduğunu gösterir. Evre III, kanserin yerel alandan daha fazla yayıldığını ve lenf nodu tutulumunun yaygın olduğunu gösterir (54,55).

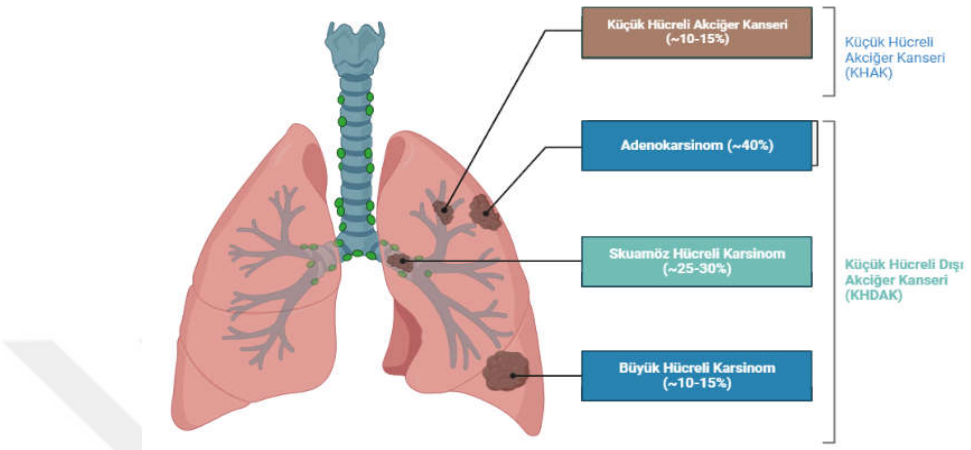
2.1.7 Akciğer Kanseri Sınıflaması

Akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak iki ana başlıkta incelenir. DSÖ'ye göre akciğer kanseri histopatolojik sınıflandırma adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom olmak üzere dörde ayrılır. Küçük hücreli karsinomun belirgin farklarından ötürü klinisyenler akciğer kanserini küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırmıştır (56) (Şekil 1).

2.1.8 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur ve dünya çapında erkekler arasında kanser ölümlerinin önde gelen nedeni ve kadınlar arasında kanser ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir. KHDAK'lı hastalar tipik olarak öksürük, dispne (zorlu nefes alma) veya hemoptizi (kan öksürme) de dahil olmak üzere solunum

semptomları ile hastaneye başvururlar ve bu hastaların üçte ikisinde ilk tanıda uzak metastaz görülmektedir. En yaygın metastaz bölgeleri kolorektal, akciğer, beyin, karaciğer, adrenal bezler ve kemiktir (58).



Şekil 1. Akciğer Kanseri Çeşitleri

2.1.9 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturur ve üç alt grupta incelenir.

Adenokarsinom: Adenokarsinom, akciğer kanserlerinin %40'ından fazlasını, tüm KHDAK'ların %60'ını ve cerrahi olarak rezeke edilen vakaların %70'inden fazlasını oluşturur (59) . Adenokarsinom, pasif içici ve sigara içmeyenlerde en sık görülen, akciğer kanserinin en yaygın histolojik alt tipidir. Yine de adenokarsinom hastalarının bir çoğunda sigara içme öyküsü görülür (60). Akciğer adenokarsinomu genellikle merkezi fibrozis ve plevral büzüşme ile periferik yerleşimli bir kitle meydana getirir. Adenokarsinomda en sık mutasyona uğrayan genler arasında KRAS ve EGFR ile TP53, KEAP1, STK11 ve NF1 gibi tümör baskılayıcı genler bulunur. EGFR'yi aktive eden mutasyonların sıklığı, hastanın yaşadığı bölge ve etnik kökenine göre büyük ölçüde değişir.

Skuamöz Hücreli Karsinom: Skuamöz hücreli karsinom akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Bunların insidansı, muhtemelen sigara içme davranışındaki değişiklikler nedeniyle son yıllarda azalmıştır. Skuamöz hücreli karsinom genellikle akciğerin orta kısmında, ana hava yolları boyunca meydana gelir ve büyük bir boyuta ulaştığında boşluklar oluşturabilir.

Skuamöz hücreli karsinomda yaygın mutasyona uğramış genler, tümörlerin %90'ından fazlasında bulunan tümör baskılayıcılar TP53'ü ve CDKN2A'yı içerir. (61,62),

Büyük Hücreli Karsinom: Büyük hücreli karsinom genellikle periferik yerleşimli, hacimli ve nekrotik görünümdedir. Tümör hücreleri, pleomorfik ve veziküler çekirdeklerle büyük ve poligonal şekildedir. Büyük hücreli karsinom, tüm akciğerlerin yaklaşık %9'unu oluşturur. Büyük hücreli karsinomun semptomları ve klinik davranışı iyi bilinmemektedi. Fakat küçük hücreli dışı karsinomla pek çok ortak yönleri vardır (63).

2.2 Akciğer Kanseri İle İlişkili Genler ve Mutasyonlar

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) Mutasyonları: EGFR geni, akciğer kanseri hastalarının yaklaşık %10-15'inde aktive edici mutasyonlar içerebilir. Bu mutasyonlar, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine yol açar ve EGFR'in aşırı aktive olmasına neden olur. EGFR mutasyonları, özellikle asyalı olmayan kadınlar ve hafif veya hiç sigara içmeyen hastalarda daha sık görülür. EGFR mutasyonları, tirozin kinaz inhibitörü (TKI) adı verilen ilaçlarla tedavi edilebilir ve bu mutasyonlara sahip hastalarda daha iyi tedavi sonuçları elde edilir.

Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) Translokasyonları: ALK geni, akciğer kanserlerinin yaklaşık %3-5'inde füzyon genleri veya translokasyonlar sonucu anormal şekilde aktive edilebilir. ALK translokasyonları, genellikle genç, hafif veya hiç sigara içmeyen hastalarda daha sık görülür. ALK inhibisyonu, bu tür mutasyonlara sahip akciğer kanseri hastalarında hedefe yönelik tedavi seçeneklerinden biridir.

Proto-onkogen tirozin-protein kinaz (ROS)1 Translokasyonları: ROS1 geni, akciğer kanserlerinin daha nadir bir alt grubunda (%1-2) translokasyonlar sonucu aktive olabilir. ROS1 translokasyonları, ALK translokasyonlarına benzer şekilde hedefe yönelik tedavilerle cevap verebilir.

Kirsten Rat Sarcoma Virüsü (KRAS) Mutasyonları: KRAS geni, akciğer kanserlerinin yaklaşık %20-35'inde aktive edilmiş mutasyonlar içerebilir. KRAS, hücre büyümesi ve proliferasyonunu düzenleyen bir onkogen olarak etki eder. KRAS mutasyonları, genellikle sigara içen hastalarda sık görülür ve bu mutasyonlara sahip tümörler tedavi açısından daha zorlu olabilir.

Tümör Protein 53 (TP53) Mutasyonları: TP53, tümör baskılayıcı genlerden biridir ve hücrelerin genomik stabilitesini koruyarak kanser gelişimini önler. Akciğer kanserlerinin %50'sinden fazlasında TP53 geninde mutasyonlar gözlenir. TP53 mutasyonları, tümörlerin agresif olma eğilimini artırabilir ve tedaviye direnç gelişmesine katkıda bulunabilir.

Retinoblastoma (RB) ve p16 Mutasyonları: RB geni ve p16 geni, hücre döngüsünü düzenleyen ve hücre proliferasyonunu inhibe eden tümör baskılayıcı genlerdir. Akciğer kanserinde RB ve p16 genlerindeki mutasyonlar sık görülür ve hücre döngüsünün düzensizleşmesine ve kontrolsüz hücresel büyümeye yol açabilir (64,65,66).

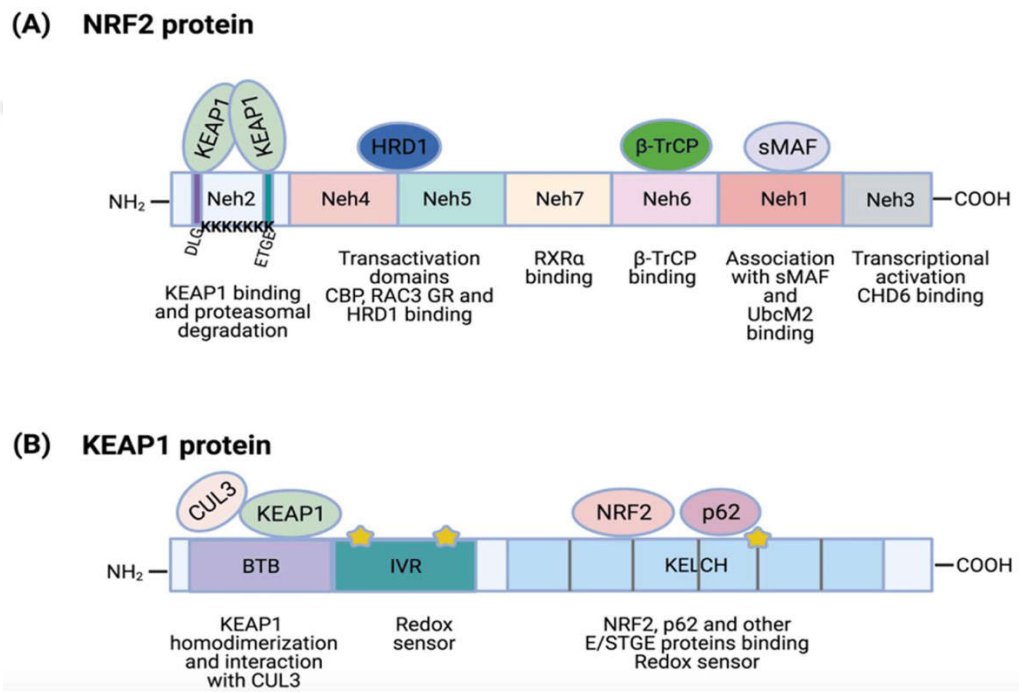
2.2.1. Keap1-Nrf2 Yolağı

Aerobik organizmalar hayatta kalmak için oksijene ihtiyaç duyar; yine de, bu organizmalar reaktif oksijen türleri (ROS) (66) olarak adlandırılan oksijen yan ürünleri üretir. Bu oksijen yan ürünleri, reaktif nitrojen türleri (RNS) ile birlikte çeşitli hücresel tepkileri düzenler (67) Bununla birlikte, bu oksitlenmiş türlerin sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekir, çünkü aşırı ROS/RNS proteinlere, lipidlere ve DNA'ya oksidatif hasar verir ve ardından hücre ölümüne yol açabilecek genetik ve/veya epigenetik değişikliklere yol açar. Bu oksidan ortama bir adaptasyon olarak hücreler, hücresel ROS seviyelerini belirli sınırlar altında tutmak için çeşitli antioksidan sistemler geliştirmiştir. Nrf2, hücresel oksidatif strese yanıt olarak birkaç transkripsiyonel programın aktivasyonundan sorumlu olduğu için bu antioksidan mekanizmaların ana düzenleyicisi olarak görev yapar (68).

NFE2L2 tarafından kodlanan Nrf2, yedi adet yüksek düzeyde korunmuş Nrf2-ECH (Neh) alanı içeren, 68 kDa moleküler ağırlığa sahip 605 amino asitli bir proteindir. Nrf2, Neh alanları adı verilen yüksek düzeyde korunmuş 7 alan içerir. . Neh1, transkripsiyon faktörü sMAF ile kompleks oluşumu, DNA bağlanması ve UbcM2'ye bağlanma için gereklidir. Neh2, Keap1 bağlanması için gerekli olan ETGE ve DLG dizilerini ve proteasomal bozunma için N Nrf2'yi hedefleyen 7 ubikuitin-lizin kalıntısını içerir. Neh3, transkripsiyonel aktivasyon (CHD6 bağlanması) için gereklidir. Neh4 ve Neh5, aktivatörleri (CBP, RAC3) veya baskılayıcıları (GR, HRD1) bağlayan işlem alanlarıdır. Neh6, β-TrCP'ye bağlanarak Nrf2 stabilitesini düzenler. Son olarak Neh7, bir Nrf2 baskılayıcı olan RXRa ile etkileşime girebilir (Şekil 2).

Keap1, ortak olarak iki kanonik alan içeren BTB-Kelch protein ailesine aittir: bir BTB alanı (Broad-Complex, Tramtrack ve Bric a brac) ve bir Kelch alanı (Kelch proteinlerinde

bulunan alan). KEAP1 proteini 5 korunmuş bölge içerir: N-terminal bölgesi, BTB, IVR bölgesi, DGR alanı ve C-terminal bölgesi; DGR ve C-terminal bölgeleri bir Kelch motifi oluşturur. BTB alanı, Keap1 homodimerizasyonunu ve CUL3 bağlanmasını kolaylaştırır. IVR bölgesi, doğrudan bir redoks sensörü görevi gören sistein bakımından zengin bir alana sahiptir. DGR/Kelch bölgeleri, Nrf2 ve p62 gibi E/STGE korumalı motiflere sahip diğer proteinlerle etkileşimlerine aracılık eden bir Kelch motifinin 6 tekrarını içerir. Bu bölge ayrıca stres algılama için ek sistein kalıntıları içerir. Yıldızlar, IVR ve Kelch alanlarında bulunan birkaç sistein kalıntısını temsil eder (70) (Şekil 2).



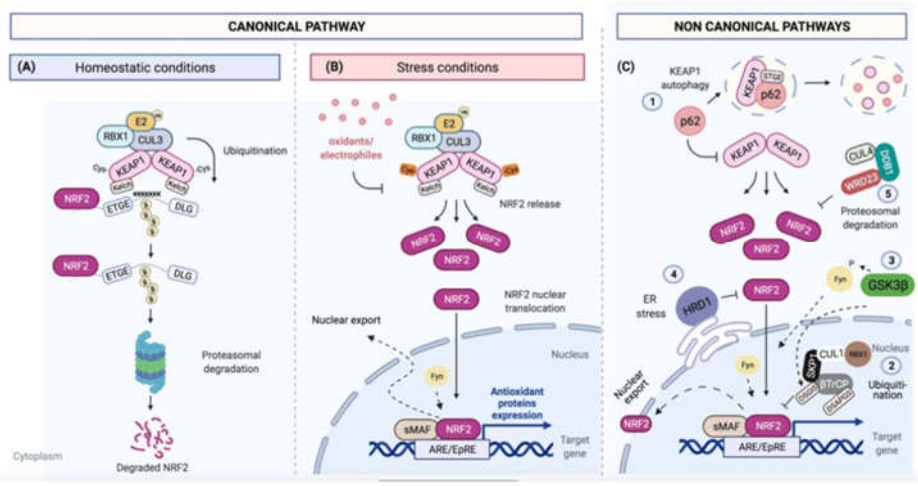
Şekil 2. Nrf2 ve Keap1 proteinlerinin yapısı (69)

Nrf2/Keap1 Yolağının Kanonik Yolu: Nrf2 proteininin yarı ömrü kısadır (70). Aslında, normal (stressiz) koşullar altında, Nrf2'nin protein seviyeleri genellikle düşüktür, çünkü Keap1, CUL3/RBX1 E3 ubikuitin bağımlı degradasyonu için Nrf2'ye bağlanır . Ubikuitin, protein yıkımında yıkıma uğrayacak protein dizilerini tutan organik kimyasal madde, yıkıma uğraması için işaretlenen proteine yapışır. CUL3 bir ubikuitin ligazdır ve Keap1 bir substrat adaptörüdür. Böylece Ubikuitilasyon sonucu Nrf2 proteazomal bozulmaya uğrar ve gen transkripsiyonu gerçekleşmez. Bu Nrf2/Keap1 etkileşimi "menteşe ve mandal" modelinde açıklanır (71). Bu modelde Keap1'in her bir Kelch alanı, NRF2 proteinine güçlü bağlanan bir ETGE motifi (menteşe) ve zayıf bağlanan bir DLG motifi (mandal) ile bağlanır (72). Bu bağlanmada,

Nrf2/Keap1 kompleksi iki farklı konformasyon benimser: açık konformasyonda, yeni sentezlenen Nrf2, ETGE motifi ile bir Keap1 molekülüne bağlanır, ancak ikinci bir Keap1molekülünün DLG motifi ile bağlanmasına kadar kapalı bir konformasyon edinilmiş, NRF2'yi 26S proteazom tarafından poli-aynı yerde bulunma ve bozunmaya yatkın hale getirmiştir (73) (Şekil 3) .

ROS stres koşulları altında, Keap1 Cys oksitlenir ve Keap1, Nrf2'den salınır ve Nrf2 seviyelerinde bir artışa neden olur .Birkaç oksidatif ve elektrofilik hücresel stresör, kritik Keap1 Cys kalıntılarını (Cys257, Cys273, Cys288, Cys297 ve Cys151) oksido-indirgeme ve/veya alkilasyon reaksiyonları yoluyla doğrudan değiştirebilir (74). Redoks modifikasyonları, Kelch-DLG bağlanmasını bozan, Nrf2'nin proteozomal bozunmasını engelleyen bir konformasyonel değişikliğe neden olur. Sonuç olarak, Nrf2 protein seviyeleri artar ve transkripsiyonel programının kontrolü için ARE/EpRE güçlendirici dizileri üzerinde hareket etmek üzere sMAF transkripsiyon faktörleriyle bir heterodimer oluşturduğu çekirdeğe translokasyonuna neden olur. Daha sonra Nrf2, Fyn gibi farklı Src ailesi kinazları tarafından fosforilasyon üzerine sitoplazmaya ihraç edilir. Nrf2 hedef genleri arasında ilaç metabolize edici enzimler (faz I-III), redoks yanıt transkripsiyon faktörleri, anti-apoptotik proteinler, karbonhidrat ve lipid metabolize edici enzimler, hücre döngüsü düzenleyicileri, proliferasyon düzenleyicileri bulunmaktadır (75). Bu nedenle, Nrf2 aktivasyonu, hücreleri çok çeşitli hücresel streslerden, en önemlisi oksidatif stresten korur (70).

Nrf2/Keap1 Yolağının kanonik olmayan yolu: Nrf2, Keap1'den bağımsız mekanizmalar tarafından da düzenlenebilir: STGE bağlama motifi aracılığıyla Keap1 otofajik bozunmasını destekleyen p62/SQSTM1 ile; (CUL1/SKP1 ile bir kompleks oluşturabilen, NRF2'nin yaygınlaşmasını ve bozulmasını teşvik eden β-TrCP ile; β-TrCP'yi fosforile edebilen GSK-3β ile NRF2 çoğalmasını arttırır; (retikulum stres koşulları altında Neh4 ve 5 alanlarıyla etkileşime girebilen ve Nrf2'yi tetikleyebilen HRD1 tarafından. Son zamanlarda, CUL4/DDB1/WDR23'ün, Nrf2'yi düzenleyen başka bir E3 ubikuitin ligaz olduğu keşfedildi, ancak mekanizması hala belirsiz.



Şekil 3: Nrf2/Keap1 Yolağı: Kanonik ve Kanonik Olmayan Yolak (69)

2.2.2. Akciğer Kanserinde Nrf2'nin İkili Rolü

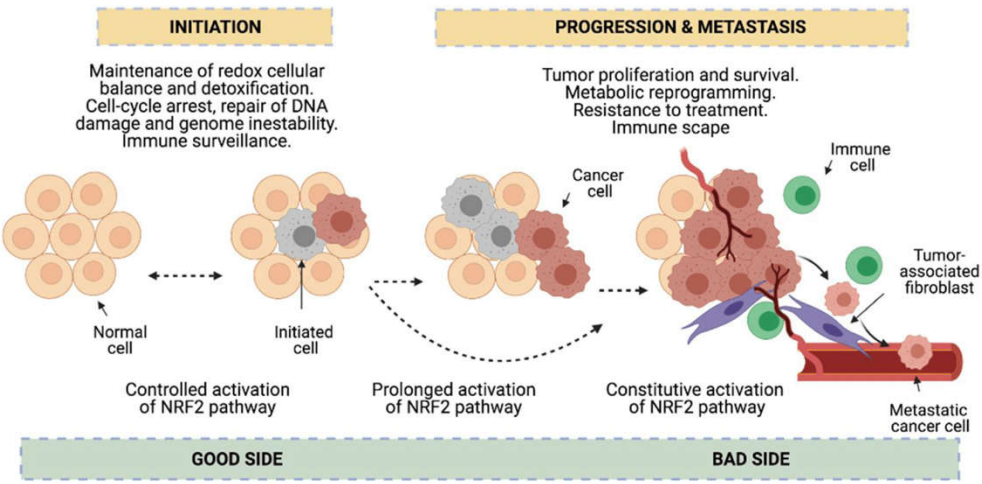
Redoks durum dengesizliği genellikle kanserde görülür. Tümör hücreleri, onkogen aktivasyonu, artan metabolik hızlar, hipoksi, mitokondriyal ve/veya peroksizomal disfonksiyonun yanı sıra ankrajdan bağımsız büyüme nedeniyle kalıcı yüksek ROS seviyeleri sergiler (71). Bu bağlamda, Nrf2, antioksidan tepkinin ana düzenleyicisi olarak hareket ederek kilit bir rol oynar. Bununla birlikte, akciğer kanseri hücrelerinde kanserin evresine bağlı olarak, işlevleri tümör oluşumu için yararlı veya zararlı olabilir. Tümör oluşumunun erken evrelerinde, Nrf2 aktivitesi, premalign karsinojenez, DNA hasarı ve ilk kanser mutasyonlarından kaçınmak için önemli görünmektedir. Bununla birlikte, ileri aşamalarda, Nrf2'nin bazı eylemleri karsinojenezi teşvik edebilir. Nrf2 yolunun aktivasyonu, tümör hücrelerini oksidatif stresten korumak için avantajlı olabilir (67).

2.2.3. KHDAK'nde Nrf2'nin İyi Tarafı

Nrf2 fonksiyonları, kanserin evresine bağlı olarak tümörijenez için yararlı veya zararlı görünmektedir. Erken aşamalarda, Nrf2 premalign karsinogenezde koruyucudur ve detoksifikasyon sürecine, DNA hasarına, hücre tutuklamasına, genom kararsızlığına ve bağışıklık gözetimine (Nrf2'nin kansere karşı iyi tarafı) yardımcı olan redoks hücresel dengesini korur (67).

2.2.4. KHDAK İlerlemesinde Nrf2'nin Kötü Tarafı

Nrf2/Keap1 yolağı, tümör gelişimine karşı çeşitli savunma mekanizmalarındaki rolü nedeniyle bir tümör baskılayıcı-sinyal yolu olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, son on yılda, bu transkripsiyon faktörünün bazı pro-onkojenik özelliklere sahip olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Aktive edici mutasyonlar bazı tümör tiplerinde birikir, bu da Nrf2/Keap1'in kanserin ilerlemesi için avantajlı bir durumu destekleyebileceğini düşündürür (76). Nrf2'nin kansere ilk katılımı hepatoselüler karsinomda keşfedilmiş olsa da (77), daha sonraki deneyler akciğer kanseri gibi diğer malignitelerde yüksek Nrf2 protein seviyeleri bulmuştur Nrf2'nin uzun süreli veya kurucu aktivasyonu kanserin ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunur, çünkü Nrf2 tümör çoğalmasını ve hayatta kalmasını, metabolik yeniden programlamayı, tedaviye direnci ve bağışıklık kaçışını (Nrf2'nin kötü tarafı) destekler (Şekil 4). Ayrıca Nrf2 aşırı ekspresyonu, kemoterapötik ilaçlara duyarlılığın azalmasıyla da ilişkilendirilmiştir. Birkaç rapor, Nrf2/Keap1 yolundaki mutasyonların platin bazlı kemoterapiden sonra daha kötü sonuçlarla bağlantılı olduğunu göstermiştir (78,79).



Şekil 4. KHDAK Gelişiminde Nrf2'nin rolü (69)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Deneysel niteliğe sahiptir.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Nisan 2021- Haziran 2022 yılları içerisinde Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

İP No	**İP Adı / Tanımı**	**Kim(ler) Tarafından Yapılacağı**	AYLAR				
			2020	**Nisan-mayıs-haziran 2021**	**Ağustos-eylül 2021**	**Ekim-kasım-aralık**	**Ocak-haziran 2022**
İP No 1	Çalışmanın Planlanması	S.Ö. (araştırmacı) G.Ö.Ş (yrd. Araştırmacı) S.A. (sorumlu)					
İP No 2	Çalışmanın gerçekleştirilmesi	S.Ö. (araştırmacı) S.A. (sorumlu)					
İP No 3	Sonuçların Değerlendirilmesi	S.Ö. (araştırmacı) S.A. (sorumlu)					
İP No 4	İstatistiksel Analiz	S.Ö. (araştırmacı) G.Ö.Ş (yrd. araştırmacı)					
İP No 5	Literatür Bilgilerinin Güncellenmesi	S.Ö. (araştırmacı) S.A. (sorumlu araştırmacı)					
İP No 6	Projenin Sonuçlandırılması	S.Ö. (araştırmacı) S.A. (sorumlu)					

3.3. Çalışma Materyali

Çalışma kapsamında Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan, KHDAK patolojik tanısı konulmuş doku örnekleri kullanılmıştır.

3.4. Araştırmanın Değişkeni

Bağımsız Değişken: Yaş, cinsiyet, hastalık evresi, sigara öyküsü,

Bağımlı Değişken: Keap1/ NRF2 gen ve protein ekspresyonu

3.5. Kullanılan Malzemeler

Steril filtreli pipet ucu, pipet, strip, ependorf, steril PBS, steril distile su, patör pipet, önlük, pudrasız nitril eldiven, formol, alkol, ksilol, lizinli lam, lamel, entellant, Keap-1 antikoru, Nrf2 antikoru, cama yazar kalem, kurşun kalem, hematoksilen, rna izolasyon kiti, c-dna çevrim kiti, qpcr master mix, Keap-1 ve Nrf2 forward reverse primerleri, beta-actin forward ve reverse primerleri, hidrojen peroksit, çeşme suyu.

3.6. Kullanılan Metotlar

<u>İmmünohistokimya:</u> Taze doku imprinti yapılan lamlara metanol sıkıldı, kurumaları beklendi. %10'luk formolde 10 dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika yıkandı. %3'lük H_2O_2 içerisinde 10 dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika yıkandı. PBS içerisinde 3 dakika bekletildi. Bir damla inhibitör CM (İnhibitör CM, SN 2058943, Roche, Germany) damlatıldı ve 5 dakika beklendi. Her bir lam için 100 µl distile suda 0,5 µl antikor olacak şekilde birincil antikor (Nrf2 ve Keap1 / Bioss-USA) damlatıldı ve lamlar ışık almayan kuru bir yerde bir gece boyunca bekletildi. PBS ile 5 dakika yıkandı. Bir damla ikincil antikor damlatılarak (OMap anti-Rb HRP (SN 2058943, Roche, Germany) 60 dakika beklendi. PBS ile 5 dakika yıkandı. DAB (Roche, Germany) damlatılarak (DAB ve H_2O_2 birebir oranda karıştırılmış şekilde) lamların üzeri naylon ile kapatıldı , 10 dakika beklendi. 5 dakika çeşme suyu ile yıkandı. 3 dakika distile su ile yıkandı. İki kere 5'er dakika çeşme suyunda yıkandı. İki dakika distile suda yıkandı. Hematoksilen içerisinde 20 dakika bekletildi. İki kere 5'er dakika çeşme suyunda yıkandı. 2 dakika distile suda bekletildi. Artan alkol serileri içerisinde 2'şer dakika bekletildi (%60'lık, %80'lik, %100'lük etanol). Lamlar çıkarılıp kurumaları beklendi, ardından

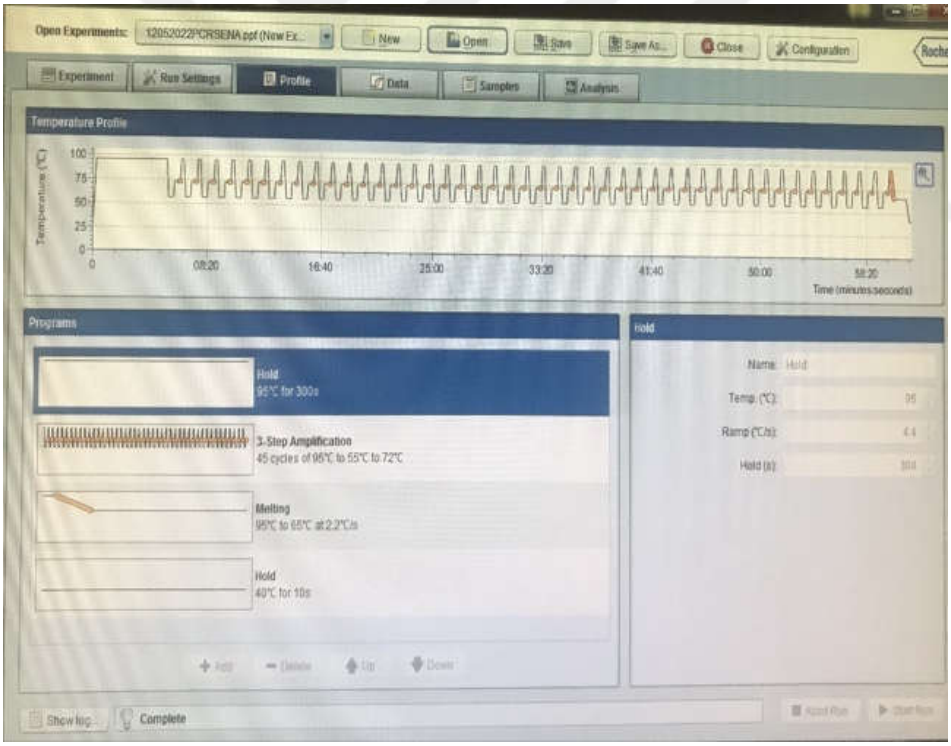
şefaflaştırma ksilolünde 1 saat bekletildi. Kuruması beklenen lamlar entellant (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) eklenerek kapatıldı.

Rna İzolasyonu:-80 derecede eppendorf içerisinde muhafaza edilen dokular oda sıcaklığına geldikten sonra homojenizatör yardımıyla ezilerek homojen hale getirildi ve High Pure RNA Isolation Kit (Roche, 11828665001) kiti kullanılarak izolasyona başlandı. 200 uL tissue lizis buffer (No:1) ve 40 uL proteinaz k (No:2) eklendi ve 37 dereceye ayarlı etüv içerisinde bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası dokuların üstüne tekrar 100 uL (No:1) tissue lysis buffer ve 40 uL (No:2) proteinaz k solüsyonu eklendi. Örnekler vortekslenerek spin yapıldı, ardında etüvde 85 derecede 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine 80 uL no:2 solüsyonu eklendi ve 55 derecede 30 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler etüvden çıkarılıp oda sıcaklığına getirilerek üzerlerine 325 uL no:3 solüsyonu ve 325 uL %100 etanol eklendi, iyice pipetaj yapıldı. Örnekler mikropipet ile kitin içinde bulunan spin-kolon tüplere alındı. 6000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra altta kalan tüp uzaklaştırıldı ve kolonlar yeni bir tüpe eklendi. Tüpler 16.000 g'de 2 dk boyunca santrifüj edildi ve altta kalan tüp uzaklaştırıldı, kolonlar yeni bir tüpe eklendi. Spin-kolon tüplerin filtrelerinin üzerine 100 uL DNAz working solution eklendi ve 15 dk boyunca oda ısısında bekletildi. Örneklere 500 uL no:4 solüsyonu eklendi ve 6000 g'de 30 saniye santrifüj uygulandı. Tüpün altındaki süpernatant döküldü ve filtrenin üstüne 500 uL no:5 solüsyonu eklenerek 6000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Bu işlem bir kez daha yapıldı ve sonrasında süpernatant döküldü. Maksimum hızda (14000 g) 2 dk boyunca santrifüj yapıldı. Alttaki tüp uzaklaştırıldı, üstteki filtre temiz 1,5 mL'lik ependorfların üzerine yerleştirildi. Filtrelerin üzerine 50 uL elution buffer (no:8) eklenerek oda sıcaklığında 1 dk boyunca bekletildi.6000g 'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Filtre kısımları çıkartılıp uzaklaştırıldı. 1.5 mL'lik ependorflarda altta kalan, elde edilen RNA'lar, daha sonra c-DNA'ya çevrilerek PCR çalışmasında kullanılmak üzere -80'e kaldırıldı.

c-DNA Çevrimi: Dokulardan izole edilen RNA'lar, -80 dereceden çıkartılıp soğuk bloğa kondu ve erimeleri beklendi. Abm cDNA kiti (abm G236) kullanılarak RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi gerçekleşti. Her örnek için 10 µL RNA, 1 µL oligo dt, 1 µL random primer, 1 µL nükleotid triposphate (dNTP) ve 1,5 µL dH20, temiz PCR striplerine konuldu ve 65 derecede beş dakika kuru ısı bloğunda bekletildi. Sonrasında örnekler buza alındı. RT2, RT6 ve RT7'den 5X buffer, total örnek miktarına göre hazırlandı ve miks oluşturuldu. Hazırlanan miks, 5,5 µL örnek başına PCR striplerine dağıtıldı. Böylece total konsantrasyon 20 µL'ye tamamlandı.

Konvansiyonel PCR cihazında (NYXTechnik, ATC401) cDNA'ya çevrim programı kullanılarak çevrimler yapıldı. Program döngüsü şu şekilde uygulandı: 25 derece 10 dk, 50 derece 30 dakika, 85 derece 5 dakika. Reaksiyon sonunda elde edilen c-DNA örnekleri -20'ye kaldırıldı.

Kantitatif Eş-Zamanlı PCR: cDNA örnekleri -20'den çıkarıldı. Keap-1 ve Nrf-2 genlerinin forward ve reverse primerleri, kontrol geni olarak Beta-actin, ve master miks (Roche LightCycler 480 SYBR Green 1 Master 04 887 352 001) kullanılarak eş-zamanlı PCR yapıldı. Her strip kuyusuna 10 µl Master miks, 2.5 µl cDNA, 3 µl PCR grade su, 1 µl forward ve 1 µl reverse primer olmak üzere hacim toplamda 20 µL'ye tamamlandı. LightCycler Nano Real-Time PCR cihazı (Roche) kullanılarak reaksiyon gerçekleştirildi. Program döngüsü şu şekildedir: 95 derece 300 sn, 45 siklus (95 derece 30sn, 55 derece 30sn, 72 derece 30sn), melting, cooling (Şekil 5).



Şekil 5. Nano PCR Cihazında Kullanılan Arayüz

3.7 İstatistik Değerlendirme:

İstatistiksel Analiz için veriler ortalama ± standart sapma biçiminde ifade edildi. Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 26.0 versiyonu kullanılarak $p<0.05$ anlamlılık düzeyinde incelendi. Dağılım analizine göre sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma; kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak sunuldu. İstatistiksel Analiz için veriler ortalama ± standart sapma biçiminde ifade edildi. Sağkalım eğrileri Kaplan Meier metodu ile oluşturuldu ve gruplar arası karşılaştırmalar Log Rank Testi ile yapıldı. Gruplar arasında ikili korrelasyonlar Spearman Korrelasyonu testi kullanılarak yapılmıştır.

3.8 Araştırmanın Sınırlılıkları:

Kullanılan hasta örneklerinin yeterli olmaması, bu araştırmanın başlıca sınırlılıklarından biridir. Dokuz Eylül Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan KHDAK patolojik tanısı konulmuş doku örneklerinin hepsinin klinik veri girişleri olmaması sebebiyle sadece 48 hasta dokusu ile çalışılmıştır. Ayrıca arşivde her hastanın akciğer tümör biyopsisi ile birlikte normal akciğer doku örnekleri olmadığı için real time pcr çalışması sadece tümör dokuları ile yapılmıştır. Son olarak, Nrf2 ve Keap1 genlerine sadece RNA düzeyinde bakılmıştır.

3.9 Etik Kurul Onayı

Bu proje Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Etik Kurulu tarafından 30.06.2021 tarihinde 2021/20-05 Protokol No'su ile onaylandı. Etik kurul onayı Ek'de sunuldu.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan, KHDAK patolojik tanısı konulmuş doku örnekleri kullanıldı ve hastaların özellikleri aşağıdaki tablolarda sunuldu (Tablo 2). Çalışmada aşağıdaki tablolarda verildiği üzere, 48 hastanın akciğer tümör ve normal dokuları ile çalışıldı ve normal dokuları ile tümör dokuları arasındaki farklılıkların incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda yer alan hastaların ortalama yaşı 61.27 idi (± 8.047). Hastaların 7 tanesi kadın, 41 tanesi erkekti. Hastalıkların evreleri açısından değerlendirdiğimizde ise 8 tanesi evre I, 20 tanesi evre II, 12 tanesi evre III, 8 tanesi evre IV'tür. Bu çalışmada hastaların yüksek oranda sigara kullandığı ve bu veriler 44 tanesi sigara kullanıyorken, 1 tanesi bırakmış ve 3 tanesi hiç içmiyor olarak kaydedildi Bu hastaların 19 tanesi adenokarsinom, 29 tanesi skuamöz hücreli karsinom tanılıydı. Hastaların yaşama süreleri klinik olarak izlenmiştir (Tablo 3). Hastaların 16 tanesi hayatta olup, 32 tanesi ex olmuştur. Hastalıksız sağkalımları 44.96 (± 39.898) iken, genel sağkalımları 51.29'dur (± 39.668). Normal dokularda IHK analizi sonucunda Nrf2 protein ekspresyonu %55.3 pozitif, 44.7 negatif olarak görülürken, tümör dokularında ise ise %45.8 pozitif, %54.2 negatif olarak kaydedilmiştir. Normal dokularda IHK analizi sonucunda Keap1 protein ekspresyonu %71 pozitif, %28.9 olarak görülürken, tümör dokularında ise %62.2 pozitif, %37.8 negatif olarak kaydedilmiştir. Tümör dokularında eş-zamanlı PCR yöntemi ile NRF2 ve KEAP1'in gen ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Hastaların %45.2'si düşük, %54.8'i yüksek NRF2 gen ekspresyonu gösterirken; %46.3'ü düşük, 53.7'si yüksek KEAP1 gen ekspresyonu göstermiştir.

Tablo.2 Hastaların genel özellikleri: yaş, cinsiyet evre sigara kullanımı ve patolojik bulgularını gösterilmiştir.

ÖZELLİKLER			
		Hasta Sayısı (n= 48)	
YAŞ	Ortalama	Max	Min
	61.27 ± 8.047 (yıl)	79	47
CİNSİYET		**Sayı**	**Frekans**
Kadın		7	14.6%
Erkek		41	85.4%
EVRE		**Sayı**	**Frekans**
I		8	16.7%
II		20	41.7%
III		12	25%
IV		8	16.7%
Sigara Kullanımı		**Sayı**	**Frekans**
Hiç İçmiyor		3	6.3%
İçiyor		44	91.7%
Bırakmış		1	2.1%
Patoloji		**Sayı**	**Frekans**
Adenokarsinom		19	39.6%
Skuamöz Hücreli Karsinom		29	60.4%

Tablo.3 Hastaların sağ kalım bilgileri: sağ kalım, genel sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım bilgileri verilmiştir.

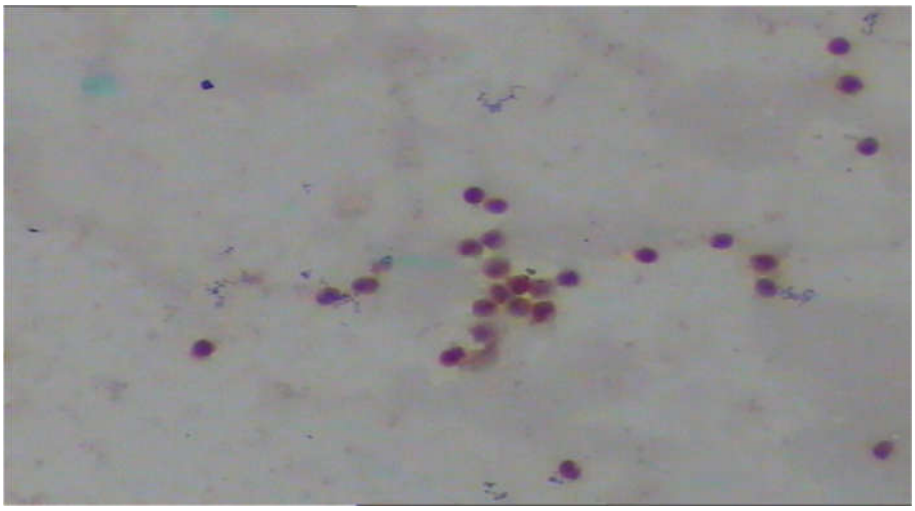
Özellikler			
		Hasta Sayısı (n=48)	
Sağkalım		**Sayı**	**Frekans**
Yaşıyor		16	%66.7
Hayatta Değil		32	%33.3
Hastalıksız Sağkalım (EFS)	**Ortalama**	**Maksimum**	**Minimum**
	44.96 ± 39.898 (Ay)	122	0
Genel Sağkalım (OVS)	**Ortalama,**	**Maksimum**	**Minimum**
	51.29± 39.668 (Ay)	112	0

4.1 İHK Boyama Sonuçları

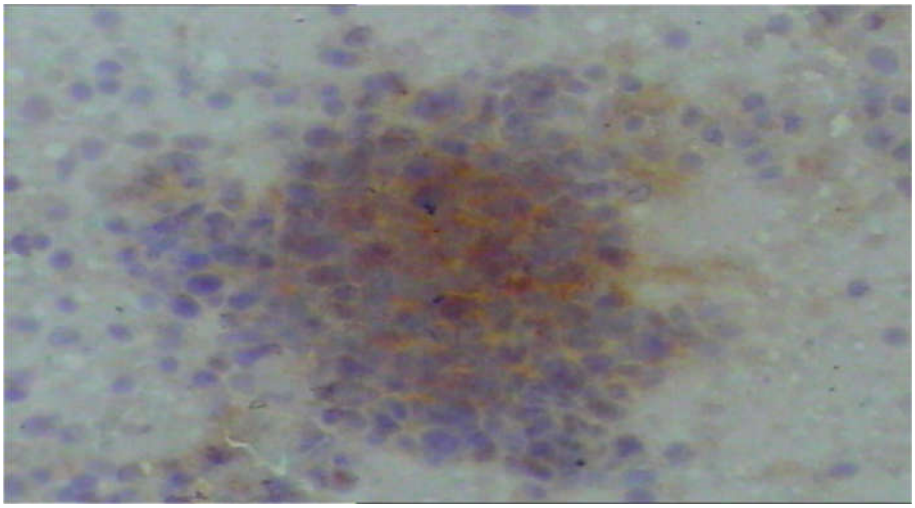
Akciğer kanseri bulgusu ile tümör dokusu ve sağlıklı dokuları bulunan hastaların tüm veri ve bilgileri DEU Temel Onkoloji Anabilim Dalı Arşiv'inden sağlandı. – 80 Arşivinde bulunan akciğer tümör ve normal parakim dokuları Nrf2 ve Keap1 antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyandı ve mikroskop altında boyamalar incelendi (Tablo4). Hastaların sağlıklı olan dokularında yapılan İHK boyama sonuçları Nrf2 protein ekspresyonu %55.3 pozitif, %44.7 negatif olarak belirlendi (Şekil 6). Akciğer tümör dokularında ise bu oran %45.8 pozitif, %54.2 negatif olarak belirlenmiştir. (Şekil 7)

Tablo.4 Tümör ve Normal dokuların IHK yöntemi ile Nrf2 ve Keap1 protein ekspresyon sonuçlarını göstermektedir.

Nrf2 İHK NORMAL DOKU (Frekans)	
Pozitif	%55.3
Negatif	%44.7
Nrf2 İHK TÜMÖR DOKU (Frekans)	
Pozitif	%45.8
Negatif	%54.2
Keap1 İHK NORMAL DOKU (Frekans)	
Pozitif	%71.1
Negatif	%28.9
Keap1 İHK TÜMÖR DOKU (Frekans)	
Pozitif	%62.2
Negatif	%37.8

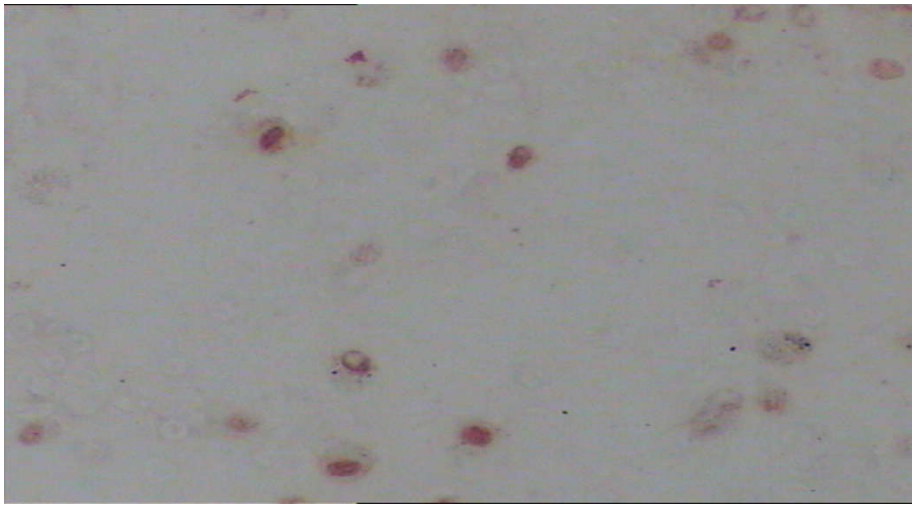


Şekil.6 IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların sağlıklı dokusunun Nrf2 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır)

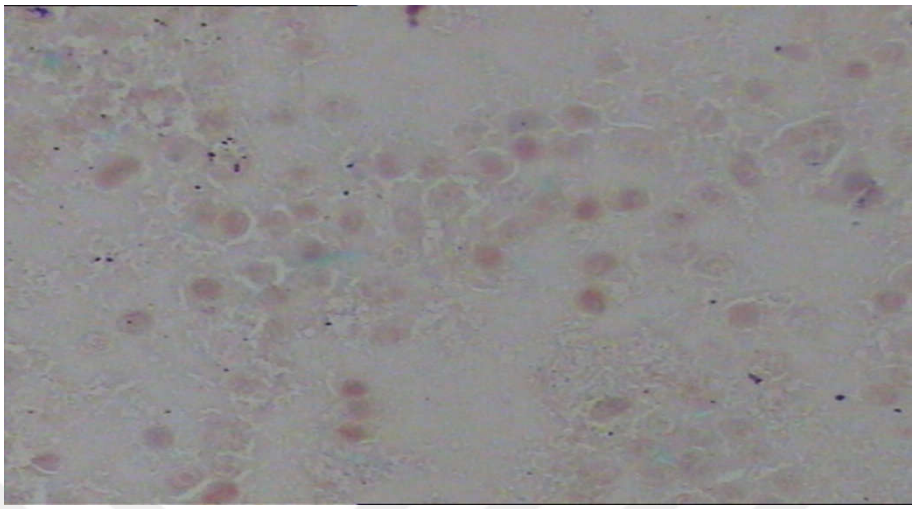


Şekil 7. IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların tümör dokusunun Nrf2 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır).

Keap1 için de akciğer kanseri hastalarının normal dokularında İHK boyama sonuçları: Keap1 protein ekspresyonu için örneklerin %71'inde pozitif, %28.9'unda negatif olarak saptanmıştır (Şekil 8). Devamında Keap1 protein ekspresyonu akciğer hastalarının tümör örneklerinde incelenmiştir. Hasta örneklerinin %62.2'sinde pozitif, %37.8'sinde negatif olarak gözlenmiştir (Şekil 9).



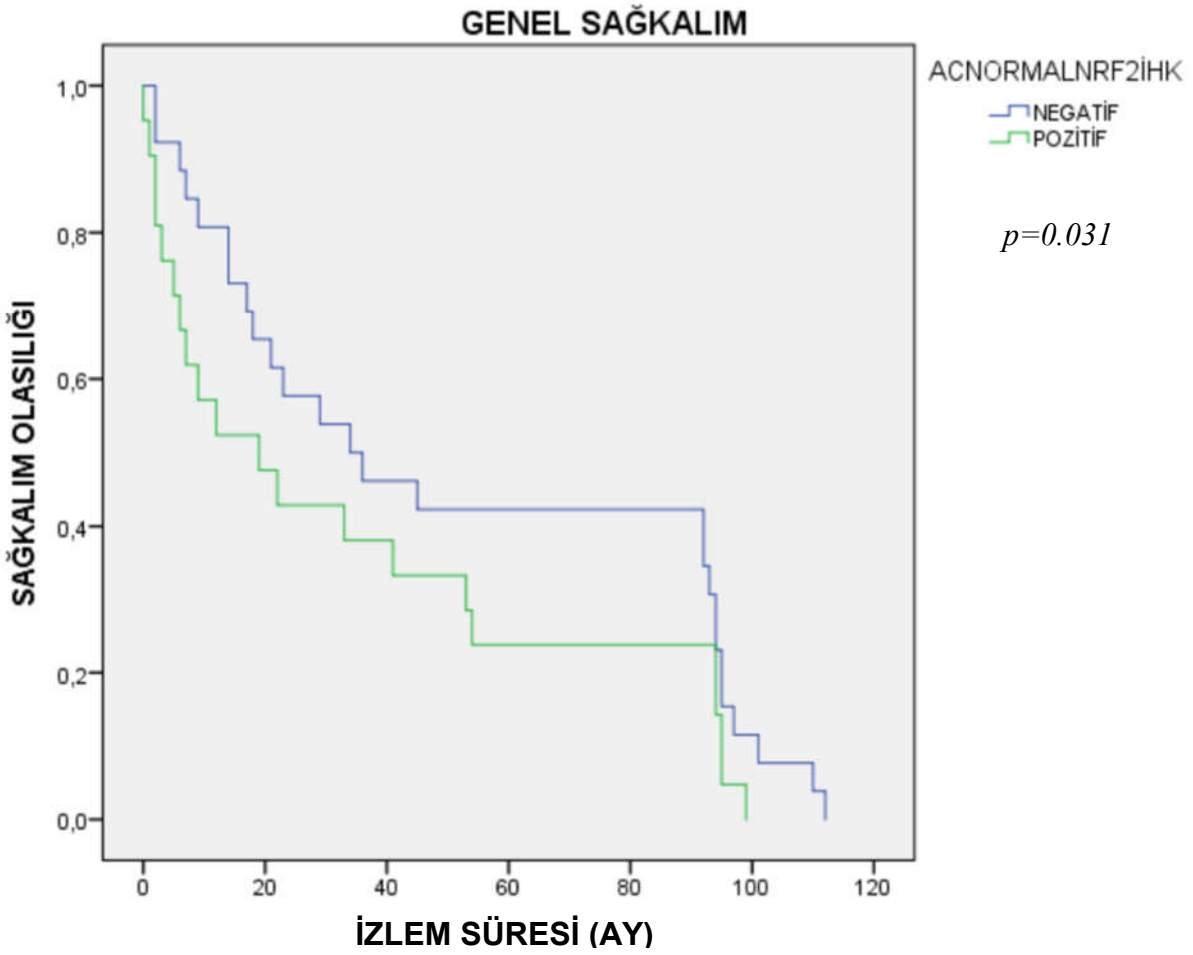
Şekil 8. IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların normal dokusunun Keap1 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır).



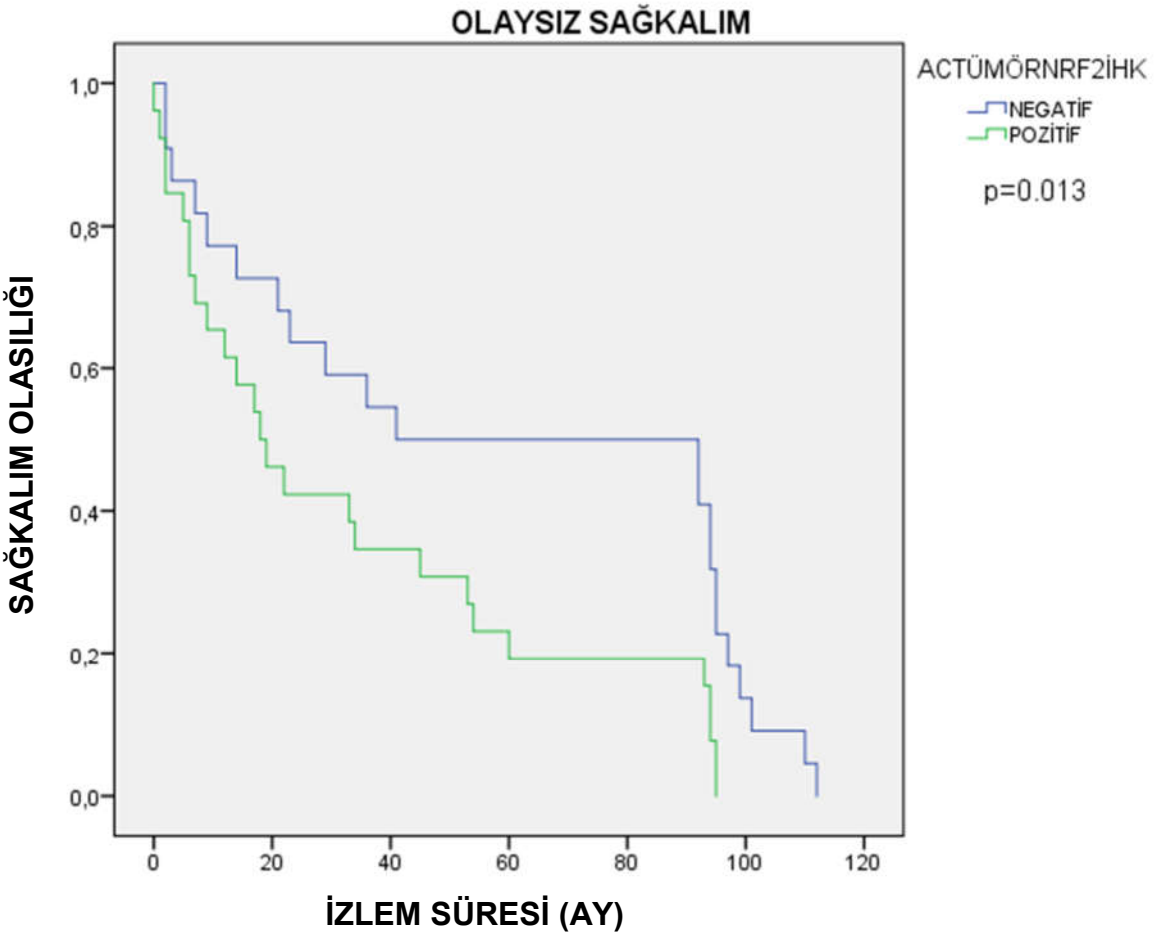
Şekil 9 IHK yöntemiyle Akciğer kanseri hastaların tümör dokusunun Keap1 antikoru ile boyanması. (Görüntü 20X büyütme, Olympus BX50 ışık mikroskobu ile alınmıştır).

IHK boyamalarının sonuçları ile hastaların sağ kalımları Kaplan Meier grafikleri ve log-rank analizi ile karşılaştırılmıştır. Buna göre Keap1 veya Nrf2 protein ekspresyonları ile hasta sağ kalımları arasında herhangi anlamlı bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır.

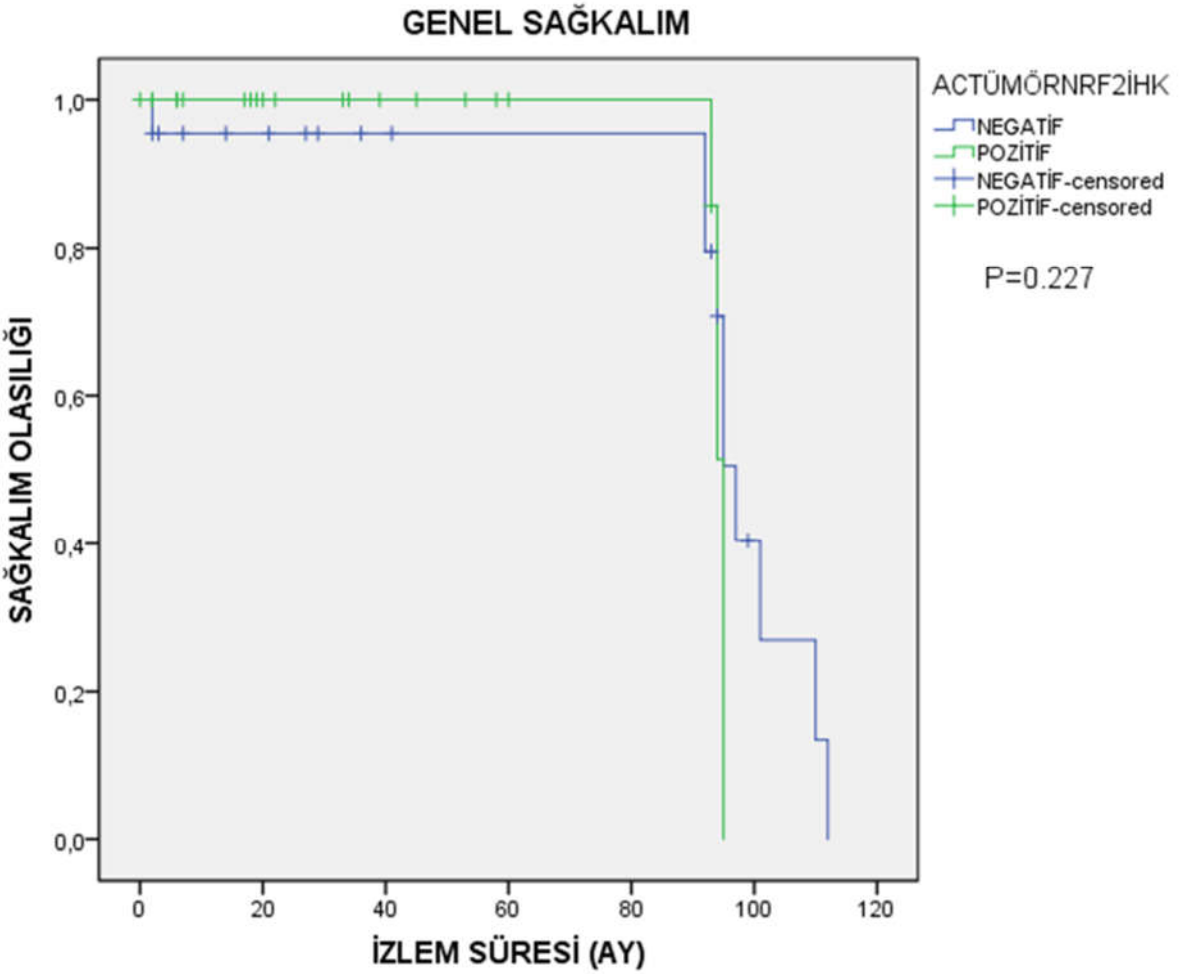
Akciğer hastalarında Nrf2'nin yüksek ekspresyonu anlamlı olarak hastalarda sağ kalımı düşürmektedir. Yani yüksek Nrf2 ekspresyonu akciğer hastalarında düşük sağ kalımla ilişkilidir. Bu durum hem hastaların normal doku örneklerinde (Şekil 10) hem de tümör örneklerinde (Şekil 11&12) incelenmiştir.



Şekil 10 Akciğer kanseri hastası normal doku örneklerinde Nrf2 protein ekspresyon düzeyinin hastalardaki genel sağ kalıma etkisi. Yüksek Nrf2 ekspresyonu gösteren hastaların anlamlı bir şekilde düşük sağ kalıma sahiptir (p=0.031).

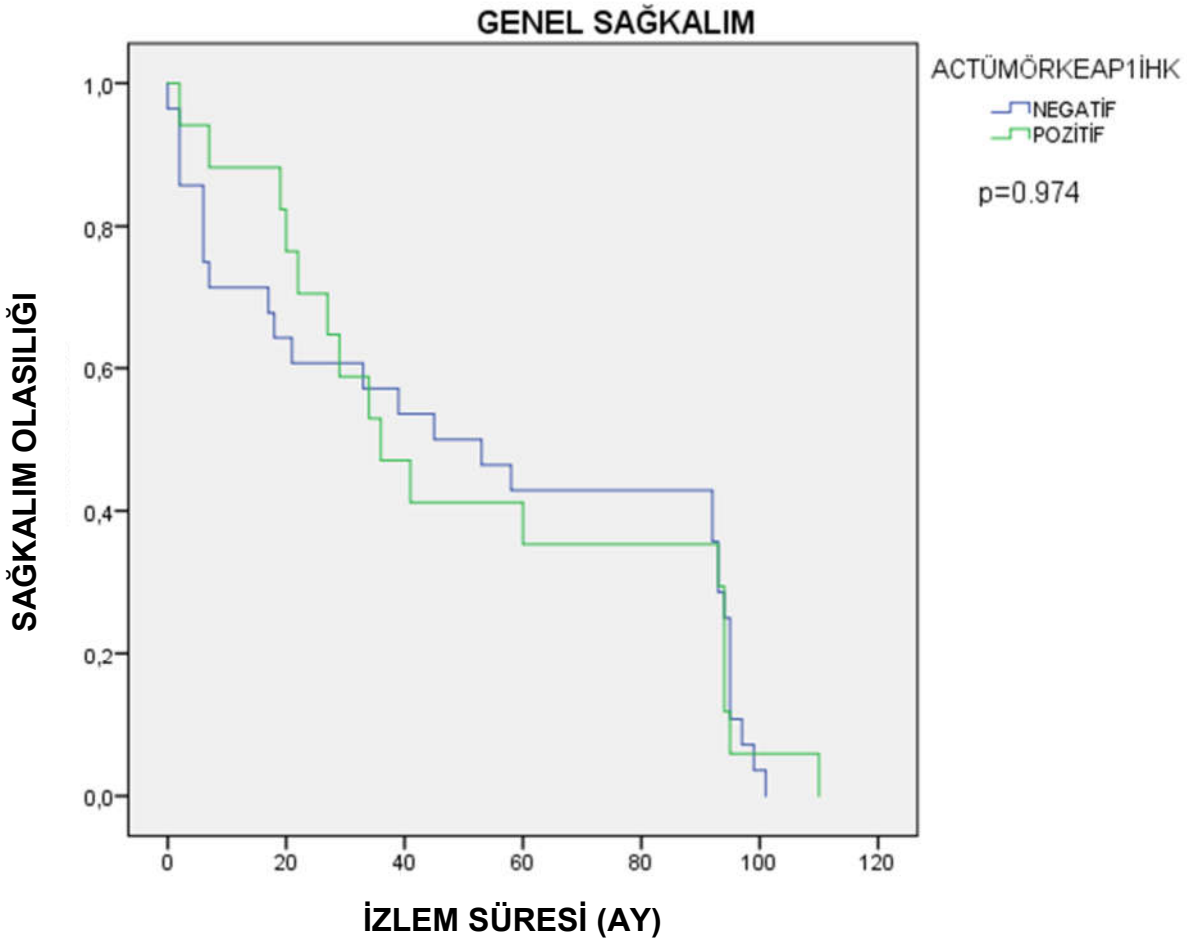


Şekil 11. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Nrf2 protein ekspresyonu incelenmiştir. Nrf2 ekspresyonu gösteren hastaların olaysız sağ kalımlarının anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır.

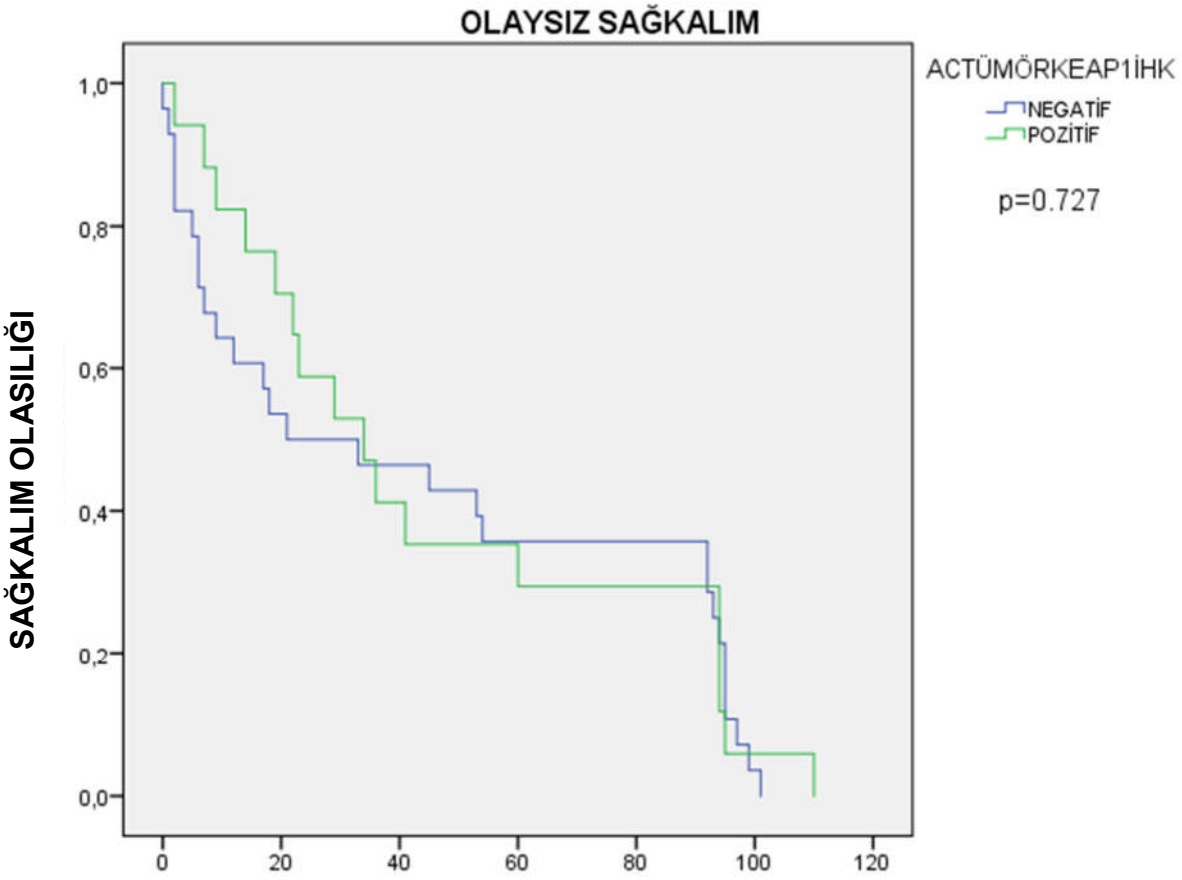


Şekil 12. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Nrf2 protein ekspresyonu hastaların sağ kalımıyla ters orantılı bir ilişki göstermektedir.

Hastalardaki Keap1 protein ekspresyon düzeyleri ile hastaların sağ kalımları arasındaki ilişki de Kaplan Meier analizi ve log-rank testi kullanılarak incelenmiştir. Akciğer kanseri hastalarında Keap1 protein ekspresyonu ile genel sağ kalım (Şekil 13) ve olaysız sağ kalım (Şekil 14) arasındaki ilişki incelenmiş ve anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.



Şekil 13. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Keap1 protein ekspresyon düzeyi ile hastaların genel sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

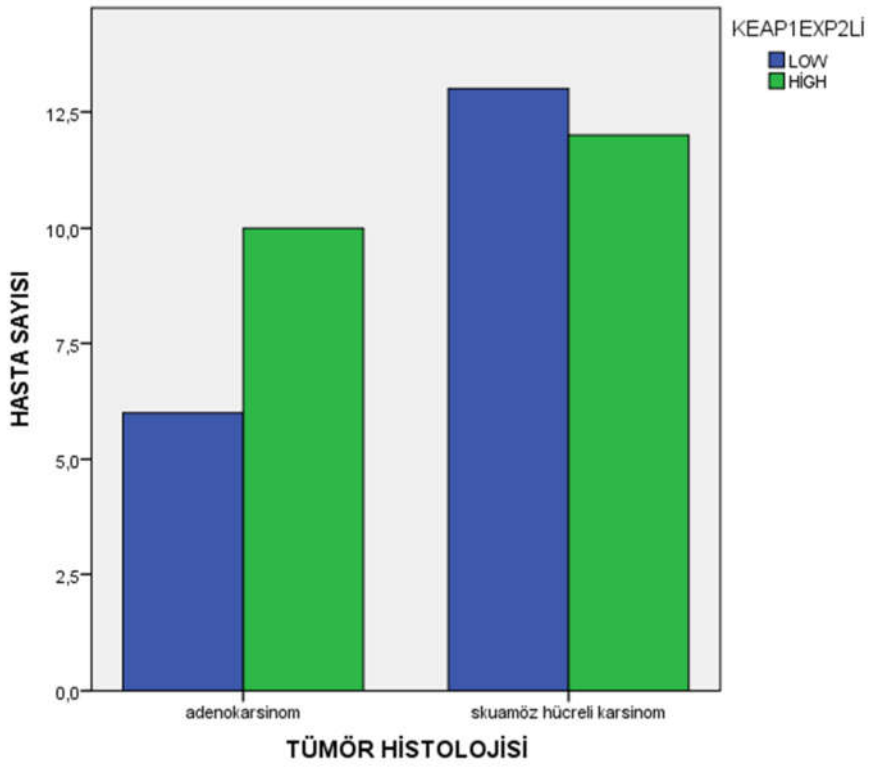


Şekil 14. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde Keap1 protein ekspresyon düzeyi ile hastaların olaysız sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

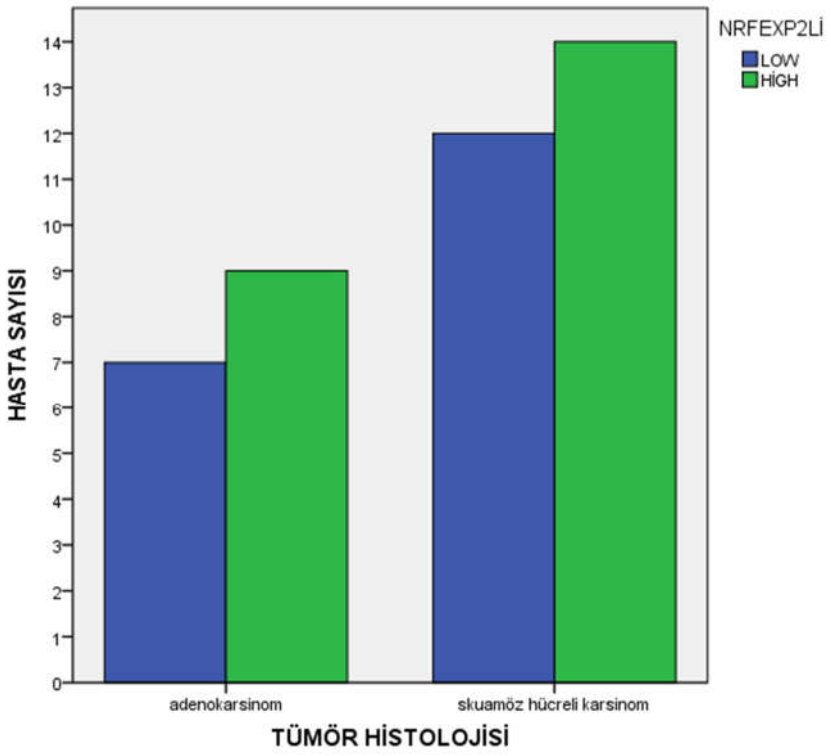
4.2 Eş-zamanlı PCR Sonuçları

Akciğer kanseri bulgusu ile tümör dokusu ve sağlıklı dokuları bulunan hastaların tüm veri ve bilgileri DEU Temel Onkoloji Anabilim Dalı Arşiv'inden sağlandı. – 80 Arşivinde bulunan dokulardan RNA için yeterli oranda parça alınarak RNA izolasyou ve c-DNA dönüşümü sağladıktan sonra Eş-zamanlı PCR (Q-PCR) ile NRF2 ve KEAP1 gen ekspresyon düzeylerini değerlendirdik.

Tümör dokularında, NRF2 ve KEAP1 gen ekspresyon seviyeleri incelendi. Hastalardan alınan tümör dokularının %45.2'si düşük, %54.8'i yüksek NRF2 gen ekspresyonu gösterirken (Şekil 15); %46.3'ü düşük, %53.7'si yüksek KEAP1 gen ekspresyonu (Şekil 16) gösterdiği belirlendi.

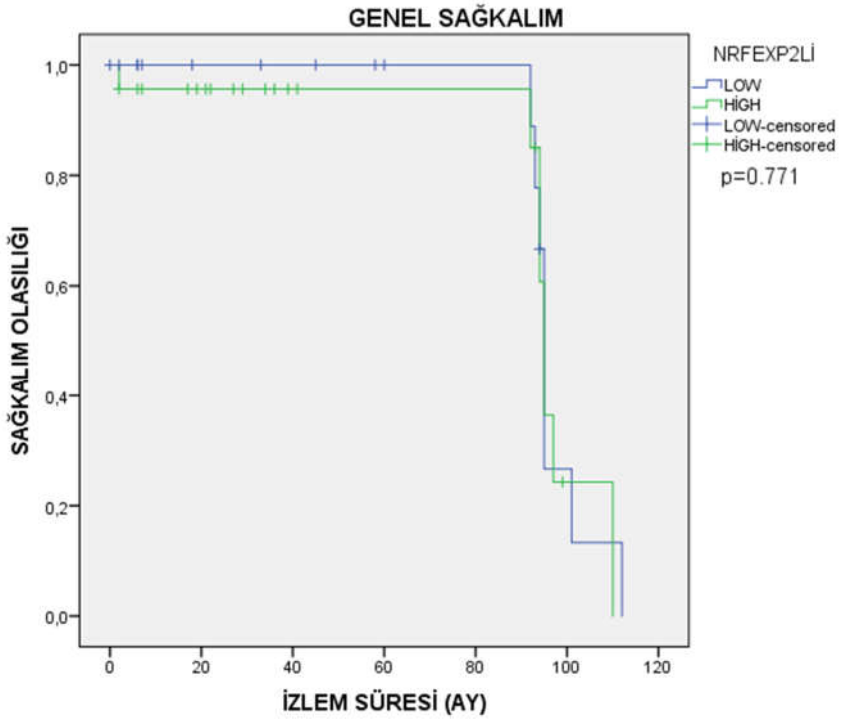


Şekil 15 Akciğer kanseri hastalarında adenokarsinom ve sküamoz hücreli karsinom örneklerinde KEAP1 gen ekspresyon düzeyleri

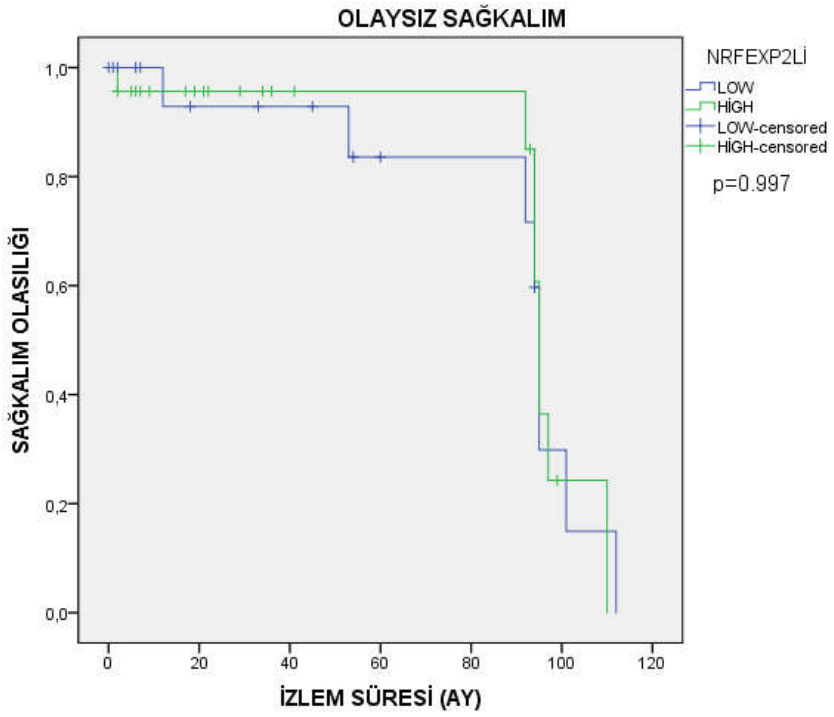


Şekil 16 Akciğer kanseri hastalarında adenokarsinom ve sküamoz hücreli karsinom örneklerinde NRF2 gen ekspresyon düzeyleri

Çalışmanın devamında hasta sağ kalımları ile NRF2 ve KEAP1 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki Kaplan Meier analizi ve log-rank testi ile değerlendirildi. NRF2 gen ekspresyon düzeyleri ile hastaların genel sağ kalımları (Şekil 17) ve olaysız sağ kalımları (Şekil 18) arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

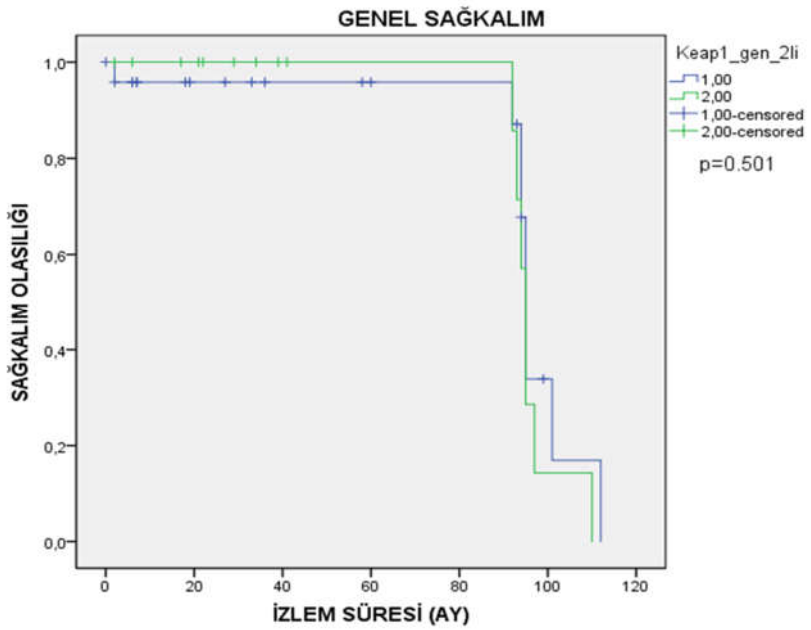


Şekil 17. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde NRF2 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların genel sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

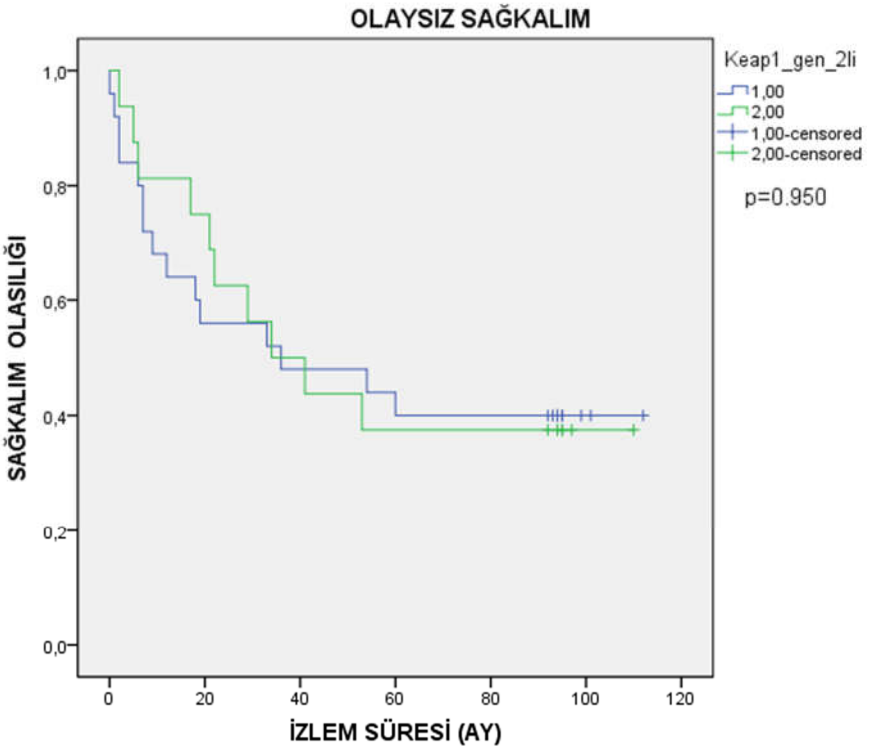


Şekil 18. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde NRF2 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların olaysız sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

KEAP1 gen ekspresyon düzeyleri ile hastaların genel sağ kalımları (Şekil 19) ve olaysız sağ kalımları (Şekil 20) arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.



Şekil 19. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde KEAP1 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların genel sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.



Şekil 20. Akciğer kanseri hastalarının tümör doku örneklerinde KEAP1 gen ekspresyon düzeyi ile hastaların olaysız sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Çalışmamızda NRF2 ve KEAP1 gen ekspresyonları ile hastaların klinik özellikleri arasındaki ilişki Sperman Korelasyon Analizi ile incelendi (Tablo 5). Buna göre NRF2 gen ekspresyonu ile KEAP gen ekspresyonu arasında anlamlı ve doğrusal bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca NRF2 gen ekspresyonunun tümör evresi ilerledikçe doğrusal olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlendi. Hastaların diğer klinik özellikleri (cinsiyet, yaş, sigara kullanımı, sağ kalım ve olay) ile NRF2 ve KEAP1 gen ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Tablo 5. Korelasyon Analizi ile Nrf2 ve Keap1 gen ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinik özellikleri arasında ilişki olup olmadığı incelenmiştir

	NRF2		**KEAP1**	
	P değeri	Korelasyon Katsayısı	*P* değeri	Korelasyon Katsayısı
NRF2	-	1	*0.001*	**.506****
KEAP-1	0.001	**.506****	-	1
YAŞ	.131	-.237	*0.363*	-.146
CİNSİYET	.344	-.150	*.055*	-.301
HİSTOLOJİ	.883	-.023	*.260*	-.180
SİGARA	.378	-.140	*.217*	-.197
TÜMÖR EVRESİ	.016	**.371***	*.637*	.076
SAĞKALIM	.637	-.075	*.630*	.078
OLAY	.883	-.023	*.877*	.025

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, yılda yaklaşık olarak 2 milyon yeni vaka ve ortalama 1.6 milyon mortalite oranı ile dünyada en sık tanı konulan ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Her ne kadar hedefe yönelik tedavi KHDAK hastalarında kemoterapiye yanıtı güçlendirse de, Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) Klinik Uygulama Klavuzu'nda bilinmeyen mutasyon durumu yada belirli mutasyonu olmayan KHDAK hastaları için platinyum temelli tedaviler standart terapi olarak kabul edilmektedir. Ancak opere edilemeyen KHDAK için tedavi genellikle palyatiftir. Akciğer kanserinde kemoterapinin başarısızlığının arkasındaki en büyük etken ilaç direncidir.(5,6,7)

Keap1/Nrf2 yolu, oksidatif stresle başa çıkmada hücreler için önemli bir belirleyicidir (8). NFE2L2, Keap1 ve ilgili genlerdeki mutasyonlar, başta akciğer kanseri olmak üzere birçok insan kanserinde bulunmuştur. Homeostazın ana düzenleyicisi olarak, Nrf2-Keap1–ARE yolu, redoks dengeleme, detoksifikasyon, proliferasyon, inflamasyon ve metabolizma gibi çeşitli hücresel süreçlerde kritik roller oynar. Çevresel veya endojen hasarlara yanıt olarak, Keap1-Nrf2 yolu, hücreleri oksidatif strese karşı koruyan ve hücre hayatta kalmasını destekleyen bir dizi sitoprotektif/savunma proteininin ekspresyonunu arttırır (14).

NRF2 transkripsiyon faktörü tarafından indüklenen gen ekspresyon programı, en önemlisi oksidatif stres olmak üzere çok çeşitli hücresel streslere karşı hücre savunma yanıtlarında kritik bir rol oynamaktadır. Diğer kanser türlerinde (kolon ve melanom gibi) ve farelerde yapılan bir dizi çalışma, NRF2 eksikliğinin kansere yatkınlığı artırdığını gösterdiğinden, ilk çalışmalara dayanarak, NRF2 ilk olarak bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edildi. (80,81,82)

Akciğer Kanserinde, NRF2 sitoprotektif fonksiyonları başlangıçta anti-onkojenik özelliklerle bağlantılıyken, bununla birlikte, son yapılan çalışmalarla artan kanıtlar, NRF2'nin metastaz ve kemoterapiye direnç sağlayan bir tümör sürücü gen olarak hareket ettiğini göstermektedir. Genel olarak, NRF2'nin sağlıklı dokularda malign transformasyonun önlenmesinde sitoprotektif etkiler göstermesine rağmen, bazı tümör tipleri üretildiğinde, NRF2, kanser hücrelerini çevresel ROS'tan koruyarak ve kemoterapinin neden olduğu hasarı sınırlayarak kanserli durumu korumada da önemlidir. KHDAK bağlamında burada tartışılan NRF2'nin bu ikili rolü, tümörün evresine bağlı görünmektedir. NRF2, genellikle tümörün başlangıç aşamalarında bir tümör baskılayıcı olarak işlev görürken, NRF2 pro-onkojenik

işlevleri genellikle tümörün ileri aşamalarında bulunur. NRF2 fonksiyonları, kanserin evresine bağlı olarak tümörigenez için yararlı veya zararlı görünmektedir. Erken aşamalarda, NRF2 premalign karsinogenezde koruyucudur ve detoksifikasyon sürecine, DNA hasarına, hücre döngüsünün durmasına, genom kararsızlığına ve bağışıklık gözetimine yardımcı olan redoks hücresel dengesini korur. Bununla birlikte, NRF2'nin uzun süreli veya kurucu aktivasyonu kanserin ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunur, çünkü NRF2 tümör çoğalmasını ve hayatta kalmasını, metabolik yeniden programlamayı, tedaviye direnci ve bağışıklık kaçışını (NRF2'nin kötü tarafını) destekler (69).

Genel olarak, mevcut veriler, Keap1-Nrf2 yolu aktivasyonunun, NSCLC'de kemoterapiye direnç kazanılmasında önemli bir rol oynadığını ve klinik olarak gözlemlenen kötü sonuçlar için bir açıklama sağladığını göstermektedir. Bu nedenle, Keap1-Nrf2 yolundaki düzensizliğin, akciğer kanseri hastalarında klinik olarak faydalı bir prognoz biyobelirteci olabileceği öne sürülmüştür (83,84). Benzer bir şekilde Inoue ve arkadaşları, 109 KHDAK vakasından klinik doku örneklerinde immünohistokimyasal analizlerle Nrf2 ekspresyonunu incelediler ve Nrf2'nin daha yüksek nükleer birikiminin daha kötü akciğer kanserine özgü sağ kalım ile ilişkili olduğunu gözlemlediler (15). Bu literatür bilgileri ile uyumlu olarak, çalışmamızda adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom hastalarında nrf2 protein ekspresyonu ile hasta genel sağ kalımı arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Nrf2 protein ekspresyonu gösteren hastaların sağ kalımları anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p=0,031).

Yang ve arkadaşları, immünohistokimya ile evre IIIB veya IV KHDAK olan 60 hastanın Nrf2 ekspresyon durumunu analiz ettiler ve her iki grupta da platin bazlı tedavilere yanıtı karşılaştırdılar. Hemen hemen tüm vakalarda nrf2 için pozitif boyama farklı derecelerde bulunsada, evre IV hastalığı olan hastalar evre IIIB hastalığı olan hastalara göre daha yüksek Nrf2 ekspresyonu sergiledi (P=0.017) (16). Literatür bilgisi ile uyumlu olarak NRF2 gen ekspresyonu tümör evresi ile karşılaştırıldığı zaman doğrusal olarak istatistiksel bir artış gözlendi (p<0,016).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

NRF2/KEAP1 yolu, insan akciğer kanserinde yaygın olarak mutasyona uğramış bir sinyal yoludur ve NRF2, metabolik yeniden programlama ve kanser proliferasyonunun önemli bir düzenleyicisidir. Aynı zamanda NRF2, hücre içi uygun antioksidan seviyesini koruyan ve hücre hayatta kalma süreçlerinde yer alan genleri kontrol ederek kanserli gelişiminde rolü olan oksidatif stresten korur

Bu çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri alt tipleri olan adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlu hastaların tümör dokularında NRF2 ve KEAP1 gen ve protein ekspresyonları incelenmiştir. Yüksek NRF2 ekpresyonu gösteren hastaların sağkalımları anlamlı olarak düşük bulunurken, KEAP1 ekpresyonu ile hasta sağkalımı arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

NRF2 gen ekspresyonu tümör evresi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç elde edilmiş olup, tümör evresi arttıkça NRF2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Dolayısıyla KHDAK'de erken evrede biyobelirteç olup olamayacağı ile ilgili daha fazla hasta sayısı ile daha çok araştırma yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Barrera-Rodríguez R. Importance of the Keap1-Nrf2 pathway in NSCLC: Is it a possible biomarker? (Review). Biomed Reports. 2018; 9(5):375–82.

2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015; 65(2):87–108.

3. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. Mayo Clin Proc. 2008; 83(5):584–94.

4. Yang Z, Qi W, Sun L, Zhou H, Zhou B, Hu Y. DNA methylation analysis of selected genes for the detection of early-stage lung cancer using circulating cell-free DNA. Adv Clin Exp Med. 2019; 28(3):361–6.

5. Nardi-Agmon I, Peled N. Exhaled breath analysis for the early detection of lung cancer: Recent developments and future prospects. Lung Cancer Targets Ther. 2017; 8:31–8.

6. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017; 67(1):7–30.

7. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. Eur J Pharmacol. 2006; 533(1–3):222–39.

8. Oesch F, Fabian E, Landsiedel R. Xenobiotica-metabolizing enzymes in the lung of experimental animals, man and in human lung models [Internet]. Vol. 93, Archives of Toxicology. Springer Berlin Heidelberg; 2019; 3419–3489 p.

9. Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. Genes Dev. 2013;27(20):2179–91.

10. Ma Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2013; 53(1):401–26.

11. Singh A, Misra V, Thimmulappa RK, Lee H, Ames S, Hoque MO, et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. PLoS Med. 2006; 3(10):1865–76.

12. Ohta T, Iijima K, Miyamoto M, Nakahara I, Tanaka H, Ohtsuji M, ve arkadaşları Loss of Keap1 function activates Nrf2 and provides advantages for lung cancer cell growth. Cancer Res. 2008; 68(5):1303–9.

13. Wang R, An J, Ji F, Jiao H, Sun H, Zhou D. Hypermethylation of the Keap1 gene in human lung cancer cell lines and lung cancer tissues. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 373(1):151–4.

14. Vollrath V, Wielandt AM, Iruretagoyena M, Chianale J. Role of Nrf2 in the regulation of the Mrp2 (ABCC2) gene. Biochem J. 2006; 395(3):599–609.

15. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Cancer Sci. 2012; 103(4):760–6.

16. Yang H, Wang W, Zhang Y, Zhao J, Lin E, Gao J, et al. The role of NF-E2-related factor 2 in predicting chemoresistance and prognosis in advanced non-small-cell lung cancer. Clin Lung Cancer. 2011; 12(3):166–71.

17. Solis LM, Behrens C, Dong W, Suraokar M, Ozburn NC, Moran CA, ve ark. NIH Public Access. 2011; 16(14):3743–53.

18. Qing Kay Li et. al. KEAP1 gene mutations and NRF2 activation are common in pulmonary papillary adenocarcinoma. Bone. 2008; 23(1):1–7.

19. Kim Y, Hammerman PS, Kim J, Yoon JA, Lee Y, Sun JM ve arkadaşları. Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients. J Clin. Oncol. 2014; 32(2):121–8.

20. Frank R, Scheffler M, Merkelbach-Bruse S, Ihle MA, Kron A, Rauer M ve arkadaşları. Clinical and pathological characteristics of KEAP1- and NFE2L2-mutated Non–Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC). Clin Cancer Res. 2018; 24(13):3087–96.

21. Copple IM, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW, Liby KT, Wigley WC. NRF2 as an Emerging Therapeutic Target. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:8165458.

22. Doll, R., & Hill, A. B. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. British Medical Journal. 1950; 2(4682), 739-748.

23. Vineis, M. Alavanja, P. Buffler, E. Fontham, S. Franceschi, Gao Y. T. ve arkadaşları. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. Journal of the National Cancer Institute. 2004; 96(2), 99-106.

24. S. Hecht, Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. Journal of the National Cancer Institute. 2002; 94(18), 1420-1435.

25. Smith, C. J., Perfetti, T. A., Garg, R., & Hansch, C. IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. Food and Chemical Toxicology. . 2003; 41(6), 807-817.

26. Vineis P, Airoldi L, Veglia F, Olgiati L, Pastorelli R, Autrup H. ve arkadaşları. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. BMJ. 2005; 330(7486):277.

27. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

28. Doll, R., Peto, R., Boreham, J., & Sutherland, I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. BMJ, 2004; 328(7455), 1519.

29. Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V; Million Women Study Collaborators. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. Lancet. 2013 Ocak 12;381(9861):133-41.

30. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F ve arkadaşları.WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. Lancet Oncol. 2009; 10(5):453-4.

31. Rushton L, Bagga S, Bevan R, Brown TP, Cherrie JW, Holmes P ve arkadaşları. Occupation and cancer in Britain. Br J Cancer. 2010 Nisan 27;102(9):1428-37.

32. Pukkala E, Martinsen JI, Lynge E, Gunnarsdottir HK, Sparén P, Tryggvadottir L ve arkadaşları. Occupation and cancer - follow-up of 15 million people in five Nordic countries. Acta Oncol. 2009; 48(5):646-790.

34. Lenters V, Vermeulen R, Dogger S, Stayner L, Portengen L, Burdorf A ve arkadaşları. A meta-analysis of asbestos and lung cancer: is better quality exposure assessment associated with steeper slopes of the exposure-response relationships? Environ Health Perspect. 2011 Aralık ;119(11):1547-55.

35. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T ve arkadaşları. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. J Clin Oncol. 2013 Eylül 20; 31(27):3327-34.

36. Shi Y, Au JS, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT ve arkadaşları. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). J Thorac Oncol. 2014 Şubat; 9(2):154-62.

37. Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA ve arkadaşları. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2008 Ekim15;14(18):5731-4.

38. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, Saintigny P, Lee JJ, Blumenschein GR ve arkadaşları. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. J Natl Cancer Inst. 2012 Şubat 8;104(3):228-39.

39. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA ve arkadaşları. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. Lancet Oncol. 2011 Ekim; 12(11):1004-12.

40. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. Front Oncol. 2017 Ağustos 28;7:193.

41. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, ve arkadaşları. Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. Cancer Discov. 2013 Haziran; 3(6):630-5.

42. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T ve arkadaşları. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. Nat Med. 2012 Şubat 12;18(3):375-7.

43. Wang X, Ouyang Y, Liu J, Zhu M, Zhao G, Bao W, Hu FB. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. BMJ. 2014 Temmuz 29; 349:g4490.

44. Albanes D, Heinonen OP, Huttunen JK, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK ve arkadaşları. Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on cancer incidence in the Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study. Am J Clin Nutr. 1995 Aralık; 62(6 Suppl):1427S-1430S.

45. Sinha R, Rothman N, Brown ED, Salmon CP, Knize MG, Swanson CA ve arkadaşları. High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. Cancer Res. 1995 Ekim15; 55(20):4516-9. PMID: 7553619.

46. World Health Organization. Cancer Today. [İnternet] 2020. Erişim adresi: https://gco.iarc.fr/today/home.

47. Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. Lancet. 2011 Ocak 8; 377(9760):139-46.

48. Fu K, Xie F, Wang F, Fu L. Therapeutic strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer patients with osimertinib resistance. J Hematol Oncol. 2022 Aralık 8;15(1):173.

49. Tomita N, Tafe LJ, Suriawinata AA, Tsongalis GJ, Nasir-Moin M, Dragnev K, ve arkadaşları. Predicting oncogene mutations of lung cancer using deep learning and histopathologic features on whole-slide images. Transl Oncol. 2022 Ekim; 24:101494.

50. Schwartz AG, Cote ML, Wenzlaff AS, Van Dyke A, Chen W, Ruckdeschel JC ve arkadaşları. Chronic obstructive lung diseases and risk of non-small cell lung cancer in women. J Thorac Oncol. 2009 Mart; 4(3):291-9.

51. American Cancer Society. Key Statistics for Lung Cancer. [İnternet]. (2021). Erişim adresi: https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/about/key-statistics.html

52. Wender R, Fontham ET, Barrera E Jr, Colditz GA, Church TR, Ettinger DS ve arkadaşları. American Cancer Society lung cancer screening guidelines. CA Cancer J Clin. 2013 Mart-Nisan; 63(2):107-17.

53. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. Nat Rev Cancer. 2014 Ağustos; 14(8):535-46.

54. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE ve arkadaşları. International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards, and Participating Institutions; International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2016 Ocak; 11(1):39-51.

55. Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, Ball D, Kim J, Lyons G ve arkadaşları. IASLC Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Boards and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2015 Temmuz; 10(7):990-1003.

56. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic Tumours. 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [İnternet] 2021. Erişim adresi: https://www.iarc.who.int/news-events/publication-of-the-who-classification-of-tumours-5th-edition-volume-5-thoracic-tumours/

57. Yang S, Zhang Z, Wang Q. Emerging therapies for small cell lung cancer. J Hematol Oncol. 2019 Mayıs 2;12(1):47.

58. Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J. Small-cell lung cancer. Nat Rev Dis Primers. 2021 Ocak 14;7(1):3.

59. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2016 Temmuz ; 25(3):447-468.

60. N. Murray, P. Coy, J. Pater, I. Hodson, A. Arnold, B. Zee ve arkadaşları. Importance of timing for thoracic irradiation in the combined modality treatment of limited-stage small-cell lung cancer. The National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Journal of

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1993 ; 11 2, 336-44 .

61. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. Nature. 2018 Ocak 24;553(7689):446-454.

62. Thakur SK, Singh DP, Choudhary J. Lung cancer identification: a review on detection and classification. Cancer Metastasis Rev. 2020 Ekim; 39(3):989-998.

63. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II ve arkadaşları. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. JAMA. 2014; 311(19):1998-2006.

64. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N ve arkadaşları. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. Br J Cancer. 2017; 116(6):802-810.

65. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. Nat Rev Cancer. 2019; 19(9):495-509.

66. Bauer AK, Hill T 3rd, Alexander CM. The involvement of NRF2 in lung cancer. Oxid Med Cell Longev. 2013; 2013:746432.

67. Sporn MB, Liby KT. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. Nat Rev Cancer. 2012; 12(8):564-71.

68. (Robertson, H.; Dinkova-Kostova, A.T.; Hayes, J.D. NRF2 and the Ambiguous Consequences of Its Activation during Initiation and the Subsequent Stages of Tumourigenesis. Cancers 2020; 12, 3609.

69. Sánchez-Ortega M, Carrera AC, Garrido A. Role of NRF2 in Lung Cancer. Cells. 2021 Haziran 24;10(8):1879.

70. Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System as a Molecular Target of Cancer Treatment. Cancers (Basel). 2020; Aralık 26; 13(1):46.

71. Rojo de la Vega, M.; Chapman, E.; Zhang, D.D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer. Cancer Cell 2018; 34, 21–43.

72. Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S. ve arkadaşları. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response. Mol Cell Biol. 2007 Kasım; 27(21):7511-21.

73. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y ve arkadaşları. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Eylül 3; 99(18):11908-13.

74. Luo Y, Eggler AL, Liu D, Liu G, Mesecar AD, van Breemen RB. Sites of alkylation of human Keap1 by natural chemoprevention agents. J Am Soc Mass Spectrom. 2007 Aralık; 18(12):2226-32.

75. Jaramillo MC, Zhang DD. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. Genes Dev. 2013 Ekim; 15;27(20):2179-91.

76. Menegon S, Columbano A, Giordano S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. Trends Mol Med. 2016;22(7):578-593.

77. Ikeda H, Nishi S, Sakai M. Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. Biochem J. 2004 Haziran; 1;380(Pt 2):515-21.

78. Choi M, Kadara H, Zhang J, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Gaffney SG. Ve arkadaşları. Mutation profiles in early-stage lung squamous cell carcinoma with clinical follow-up and correlation with markers of immune function. Ann Oncol. 2017 Ocak; 1;28(1):83-89

79. Jeong Y, Hellyer JA, Stehr H, Hoang NT, Niu X, Das M ve arkadaşları. Role of KEAP1/NFE2L2 Mutations in the Chemotherapeutic Response of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2020 Ocak; 26(1):274-281..

80. Zhu H, Jia Z, Trush MA, Li YR. Nrf2 Deficiency Promotes Melanoma Growth and Lung Metastasis. React Oxyg Species (Apex). 2016; 2(4):308-314.

81. Hammad A, Zheng ZH, Gao Y, Namani A, Shi HF, Tang X. Identification of novel Nrf2 target genes as prognostic biomarkers in colitis-associated colorectal cancer in Nrf2-deficient mice. Life Sci. 2019; 238:116968.

82. Hammad A, Zheng ZH, Gao Y, Namani A, Shi HF, Tang X. Identification of novel Nrf2 target genes as prognostic biomarkers in colitis-associated colorectal cancer in Nrf2-deficient mice. Life Sci. 2019; 238:116968.

83. Liu X, Sun C, Liu B, Jin X, Li P, Zheng X, Zhao T, Li F, Li Q. Genistein mediates the selective radiosensitizing effect in NSCLC A549 cells via inhibiting methylation of the keap1 gene promoter region. *Oncotarget.* 2016; 7:27267–27279

84. Cho JM, Manandhar S, Lee HR, Park HM, Kwak MK. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. Cancer Lett. 2008; 260:96–108.

8. EKLER

EK.1 Katkı

TC

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ

(Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi)

Konu:Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih
20.10.2022

Sayın : Dr.Öğr.Üyesi GÖKÇEN ÖMEROĞLU ŞİMŞEK

Aşağıda bilgileri özetlenen proje onerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. Zeynep ARIKAN
Koordinatör

Proje Başlığı: Keap1Nrf2 Yolağının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserindeki Rolü

Proje No: TYL-2022-2756

Proje Türü: Y.Lisans

Süresi: 6 ay

Başlama Tarihi: 20.10.2022

Onaylanan Bütçesi: 29998,16 TL

Proje Yürütücüsü: Dr.Öğr.Üyesi GÖKÇEN ÖMEROĞLU ŞİMŞEK

Araştırmacı(lar): PROF.DR. SAFİYE AKTAŞ, ÖĞRENCI SENA ÖKMEN

EK.2 Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. Safiye Aktaş

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	6485-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Keap-1/Nrf2 Yolağının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserindeki Rolü**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. Safiye Aktaş Onkoloji Enstitüsü	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2021/20-05**	**Tarih:30.06.2021**
	Prof.Dr. Safiye Aktaş'ın sorumlusu olduğu **"Keap-1/Nrf2 Yolağının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserindeki Rolü"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Emel Çalıkoğlu (Başkan Yardımcısı)	Prevantif Onkoloji	Onkoloji Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Suna Asilsoy	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aliye Akcalı	Periodontoloji	Diş Hekimliği Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Özlenen Şimşek Papur	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç Yüksel	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	

EK. 3 Özgeçmiş



SENA ÖKMEN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

03 Eylül 2019 - Şu Anda (4 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: -

03 Eylül 2012 - 18 Temmuz 2016 (3 yıl 11 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ PR. (İNGİLİZCE)
Diploma Numarası: 4767
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.03 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

SENA ÖKMEN, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2019 - 2, 01.10.2019 - 30.09.2021.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0