

**T.C.**  
**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ**  
**MERAM TIP FAKÜLTESİ**  
**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**LARENKS KANSERLERİNDE TÜM GENOM EKSPRESYON FARKLILIĞININ  
BELİRLENMESİ VE KLİNİK ÖNEMİ**

**DR. EMİNE GÖKTAŞ**

**UZMANLIK TEZİ**

**KONYA-2016**



**T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**LARENKS KANSERLERİNDE TÜM GENOM EKSPRESYON FARKLILIĞININ  
BELİRLENMESİ VE KLİNİK ÖNEMİ**

**DR. EMİNE GÖKTAŞ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: PROF. DR. MAHMUT SELMAN YILDIRIM**

**KONYA-2016**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM'a, eğitimimde büyük emek ve katkısı olan Doç.Dr. Ayşe Gül ZAMANI'ye ve tüm Tıbbi Genetik ABD öğretim üyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime olan katkılarından dolayı Prof. Dr. Kayhan ÖZTÜRK'e, Zehra GÜRÜN'e ve Eren YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Berber çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma, bölümümüzde görev yapan tüm personele teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan canım annem, babam ve kardeşlerime; her zaman yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Harun Enes GÖKTAŞ'a ve en büyük mutluluk kaynağım canım kızım Yaren'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Eylül 2016**

**Dr. Emine GÖKTAŞ**

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 151518008 proje numarası ile desteklenmiştir.

## ÖZET

### LARENKS KANSERLERİNDE TÜM GENOM EKSPRESYON FARKLILIĞININ BELİRLENMESİ VE KLİNİK ÖNEMİ

DR. EMİNE GÖKTAŞ, UZMANLIK TEZİ, KONYA 2016

**Amaç:** Erişkin tümörlerinin %2'sini oluşturan larenks kanserleri, baş boyun bölgesinin en sık görülen malign tümörlerindedir. Türkiye'deki erkek ölümünün %7'sinden sorumlu olan larenks kanserlerinin mortalite oranları oldukça yüksektir. Çalışmamızda larenks kanserli bireylerin tümör dokusunda normal dokuya göre ekspresyonu artan ya da azalan tüm genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi ve Karatay Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Polikliniği'ne başvuran, klinik ve histopatolojik olarak larenks kanser tanısı almış 12 vakadan operasyon sırasında tümörlü ve sağlam taze doku örnekleri alınarak(24 örnek) RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar tüm genom ekspresyon mikromarray yöntemi (Illumina iScan, HumanHT-12 V4 Expression Bead Chip) ile çalışıldı ve tümörlü dokuda normal dokuya göre ekspresyonu anlamlı derecede artan ve azalan genler belirlendi.

**Bulgular:** 47.323 prob kullanılarak yapılan çalışmada 14.294 mRNA'da normal dokuya göre ekspresyon farklılığı saptandı. Ekspresyon farklılığının anlamlılığı için FC değeri 2 olarak kabul edildiğinde; 22 gende anlamlı ekspresyon artışı ve 2 gende anlamlı ekspresyon azalışı gözlemlendi. Etkilenen genlere yönelik yapılan yolak analizinde ise hücre siklus yolağı ve ekstrasellüler matriks yıkım yolağı aktivasyonu artan yolakların başında gelirken; elektron transport zincir yolağı da baskılanan yolakların başında gelmekteydi.

**Sonuç:** Tüm genom ekspresyon analizi ile larenks tümör etiyolojisinde rolü olduğu bilinen 13 genin yanı sıra daha önce larenks kanserlerinde tanımlanmayan ancak vakalarımızın kanserli dokularında normal dokuya göre farklı eksprese olan 11 yeni gen tanımlanmıştır. İlk kez bizim çalışmamızda belirlenen bu genlerin larenks kanserli olgularda erken tanı, prognoz tayini ve hedefe yönelik tedavi için biomarker olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ekspresyon, larenks kanseri, mikromarray

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF WHOLE GENOME EXPRESSION DIFFERENCES IN LARYNX CANCERS AND CLINICAL SIGNIFICANCE

DR. EMİNE GÖKTAŞ, SPECIALITY THESIS, KONYA 2016

**Aim:** Laryngeal cancers which constituting 2% of adult tumors are the most common malignant tumors of the head and neck region. The mortality rate of larynx cancers which is responsible for around 7% of male deaths in Turkey is quite high. In our study, is aimed to determine of decreasing or increasing the expression of all genes in the tumor tissue than normal tissue in laryngeal cancer patients.

**Method:** During surgery, tumor and normal tissue samples were taken from the 12 patients who admitted to Selçuk University Selçuklu Medical Faculty and Karatay University Medical Faculty and diagnosed larynx cancer as clinical and histopathological and RNA isolation was performed. Izolated RNA was studied by whole genome expression microarray method (Illumina iScan, HumanHT-12 V4 Expression Bead Chip) and gene were identified which expression significantly increasing and decreasing tumor tissue than in normal tissue.

**Findings:**In study using 47,323 probe, expression differences revealed at 14.294 mRNA. When the FC value is considered to be 2 for the significance of the expression differences, increased expression of 22 genes and decreased expression of two genes were observed. While the cell cycle pathway and extracellular matrix degradation pathway are the most active pathway, electron transport chain pathway is one of the most repressed pathways according to the pathway analysis of affected genes.

**Results:**In our case, 11 new genes have been identified which is differentially expressed in cancerous tissue compared to normal tissue in addition to 13 genes known to be involved in the etiology of laryngeal tumors with whole genome expression analysis. These genes which identified for the first time in our study, are thought to be biomarker for early diagnosis, prognosis and targeted therapy on larynx cancer patients.

Keywords: Expression, larynx cancer, microarray

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TABLolar.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. LARENKSİN YAPISI VE GÖREVLERİ.....	3
2.1.1. Anatomi.....	3
2.1.2. Embriyoloji .....	4
2.1.3. Histoloji.....	4
2.1.4. Fizyoloji.....	5
2.2. LARENKS KANSERİ.....	5
2.2.1.Epidemiyoloji.....	5
2.2.2.Etyoloji.....	6
2.2.3.Histopatoloji.....	8
2.2.4.Evreme.....	9
2.2.5.Larenks kanser genetiği.....	12
2.3. GEN EKSPRESYONU.....	17
2.3.1.Santral dogma.....	18
2.3.2.Transkripsiyon.....	18
2.3.3.Translasyon.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	25
3.1. Araştırmanın tipi .....	25
3.2. Araştırma bölgesi ve zamanı .....	25
3.3. Araştırma evreni ve yeri .....	25
3.4. Örneklem seçme kriterleri .....	25
3.5. Çalışma gruplarının randomizasyonu.....	25
3.6. Araştırma öncesi bilgilendirme.....	26
3.7. Araştırmanın izni ve etik durum.....	26
3.8. Gen Ekspresyonu Analiz Metodları.....	26
3.8.1. Total RNA izolasyonu.....	30
3.8.2 RNA'dan cDNA sentezi.....	37
3.8.3 Biotin işaretli RNA'nın in-vitro transkripsiyonu.....	39
3.8.4 Numunelerin Cihaza Yüklenme Aşaması.....	42
3.9. İstatistiksel Analizler.....	53
4. BULGULAR.....	54
5.TARTIŞMA.....	69
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
7.KAYNAKLAR.....	86
Ek 1: Hasta Onam Formu	
Ek 2: Etik kurul kararı	

## TABLolar

<b>Tablo 2.</b> Evrelendirme tablosu.....	12
<b>Tablo 4.1.</b> Örnekler ve gruplama.....	54
<b>Tablo 4.2.</b> Karşılaştırma Grupları.....	55
<b>Tablo 4.3.</b> FC 2 kabul edildiğinde down-regüle olan genlerin listesi.....	64
<b>Tablo 4.4.</b> FC 2 kabul edildiğinde up-regüle olan genlerin listesi.....	64
<b>Tablo 4.5.</b> İçerdiği genlerde anlamlı down-regülasyon olan yolaklar.....	65
<b>Tablo 4.6.</b> İçerdiği genlerde anlamlı up-regülasyon olan yolaklar.....	67



## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Larenks'in genel anatomik görünümü.....	3
Şekil 2.2. Larenks boşluğu; supraglottik, glottik ve subglottik bölgelere ayrılır.....	4
Şekil 2.3. Tütün karsinogenleri ve metabolitlerinin kanser oluşumundaki rolü.....	7
Şekil 2.4. Santral Dogma .....	18
Şekil 2.5. Transkripsiyon aşamaları.....	19
Şekil 2.6. CAAT ve TATA kutusu.....	20
Şekil 2.7. mRNA işlenmesi.....	21
Şekil 2.8. Ökaryotik canlılarda ribozomun yapısı.....	22
Şekil 2.9. Translasyon mekanizması.....	23
Şekil 3.1. NorthernBlot tekniği .....	27
Şekil 3.2. RNaz'dan Koruma Deneyi teknik aşamaları.....	28
Şekil 3.3. Mikroarray yönteminin aşamaları.....	30
Şekil 3.4. NorgenBeadTube.....	31
Şekil 3.5. Petri kabı içerisinde dokunun parçalanması.....	31
Şekil 3.6. BeadBugMicrotubeHomojenizatör.....	32
Şekil 3.7. Micro 200R HettichZentifugensantrifüj.....	32
Şekil 3.8. Combi-Spin FVL-2400 N BIOSAN .....	32
Şekil 3.9. CH-100 BioSan ısı bloğu.....	32
Şekil 3.10. Norgenspincolumn tüpleri.....	33
Şekil 3.11. ThermoScientificNonodrop 2000c.....	34
Şekil 3.12. Jel-RNA boyası karışımı.....	34
Şekil 3.13. RNA çipinin RNA çip istasyonuna yüklenmesi.....	35
Şekil 3.14. Jel-boya karışımının eklenerek RNA çip istasyonunun kapatılması.....	35
Şekil 3.15. Kuyucuklara RNA eklenmesi.....	36
Şekil 3.16. Denatüre edilen ladder ve örneklerin kuyucuklara yüklenmesi.....	36
Şekil 3.17. RNA çipi için özel olarak tasarlanmış vorteks.....	36
Şekil 3.18. Agilent 2100 Bioanalyzer.....	37
Şekil 3.19. "TargetAmp™-NanoLabeling Kit forIllumina® ExpressionBeadChip®" kit prosedür şeması.....	38
Şekil 3.20. Hybex ısı bloğu .....	39
Şekil 3.21. BIO-RAD C-1000 Touch PCR cihazı.....	39
Şekil 3.22. Norgen's RNA Clean-up ve Concentration Kit çalışma şeması.....	40

Şekil 3.23. Hibridizasyon Fırını.....	42
Şekil 3.24. GasketinHibridizasyon Çemberine Yerleştirilmesi.....	43
Şekil 3.25. Hibridizasyon Çember Haznesine HCB eklenmesi.....	44
Şekil 3.26. Çipin Yerleştirilmesi.....	44
Şekil 3.27. Çipin Hibridizasyon Çemberine Yerleştirilmesi.....	45
Şekil 3.28. Hybex su banyosuna High TempWashBuffer eklenmesi.....	46
Şekil 3.29. Wash E1BC ve Etanol solüsyonları.....	46
Şekil 3.30. Çip üzerindeki koruyucu yüzeyin çıkarılması.....	47
Şekil 3.31. BeadChiplerinslideracklara yerleştirilmesi.....	47
Şekil 3.32. Slideracklara yerleştirilen çiplerin High TempWashBuffera transferi.....	48
Şekil 3.33. SliderackınWashBuffer ile yıkanması.....	48
Şekil 3.34. Side racklarınWashBuffer solüsyonu ile karıştırılması.....	49
Şekil 3.35. Sliderackın etanol ile karıştırılması.....	49
Şekil 3.36. BeadChip'in yıkama kabına yerleştirilmesi.....	50
Şekil 3.37. Yıkama kabı içindeki BeadChip'in çalkalanması.....	50
Şekil 3.38. Çiplerin streptavidin ile işaretlenmesi.....	51
Şekil 3.39. BeadChip yıkama aşaması ile proba tutunamayan RNA'ların uzaklaştırılma şeması.....	51
Şekil 3.40. Sliderack kurutulması.....	52
Şekil 3.41. Slideracksantrifüj aşaması.....	52
Şekil 3.42. BeadChip'in cihaza yerleştirilmesi.....	53
Şekil 3.43. BeadChip okuma aşaması.....	53
Şekil 4.1. RNA biyoanalizasyon sonuçları, 6 hastamıza ait jel görüntüsü.....	56
Şekil4.2. 1 nolu örneğimize ait RNA biyoanalizasyon sonuçları, elektroforegram Görüntüsü.....	57
Şekil 4.3. Profile Plot gösterimi.....	58
Şekil 4.4. Box Plot Gösterimi.....	59
Şekil 4.5. PCA Plot Gösterimi.....	59
Şekil 4.6. Gruplar baz alınarak yapılan Cluster Analizi.....	60
Şekil 4.7. H1 vs K1 upregüleprobların sıcaklık haritası.....	61
Şekil 4.8. H1 vs K1 downregüleprobların sıcaklık haritası.....	62
Şekil 4.9. H3 nolu vakamıza ait hücre siklus yolağı.....	68

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

<b>AIF:</b>	Apoptozis uyarıcı faktör
<b>AJCC:</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>ATP:</b>	Adenozin trifosfat
<b>CCND1:</b>	Siklin D1
<b>CDK4:</b>	Siklin bağımlı kinaz 4
<b>cDNA:</b>	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
<b>CK:</b>	Sitokeratin
<b>cRNA:</b>	Tamamlayıcı ribonükleik asit
<b>COX-2:</b>	Siklooksijenaz tip 2
<b>CYP1A1:</b>	Sitokrom p450, aile 1, üye A1
<b>CPKIs:</b>	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
<b>DTT:</b>	Dithiothreitol
<b>DNA:</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>EBS:</b>	Tip 2 Östrojen Bağlanma Bölgesi
<b>EDC:</b>	Epidermal farklılaşma kompleksi
<b>EGFR:</b>	Epidermal Growth Faktör Reseptörü
<b>EMT:</b>	Epitelyal-mezenşimal dönüşüm
<b>FC:</b>	Kat değişimi
<b>GLUT1:</b>	Glukoz transporter 1
<b>GTP:</b>	Guanozin Trifosfat
<b>HPV:</b>	Human Papilloma Virüs
<b>HRAS:</b>	Harvey rat sarkoma viral onkojen homologu
<b>hTERT:</b>	Human telomerase reverse transcriptase
<b>ISH:</b>	İn situ Hibridizasyon
<b>IVT:</b>	İn-vitro transkripsiyon
<b>KRAS:</b>	Kirsten rat sarkoma viral onkojen homologu
<b>LOH:</b>	Heterozigosite kaybı
<b>LSCC:</b>	Larenks skuamöz hücreli karsinomu
<b>MDM2:</b>	Mouse double minute 2 homolog
<b>MMP:</b>	Matriks metalloproteinazlar
<b>mRNA:</b>	Mesajcı ribonükleik asit
<b>NRAS:</b>	Nöroblastoma rat sarkoma viral onkojen homologu

<b>NTP:</b>	Nükleozid trifosfat
<b>PCNA:</b>	Proliferating cell nuclear antigen
<b>PCR:</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PI3K:</b>	Fosfoinozitol 3 kinaz
<b>RAS:</b>	Rat sarkoma viral onkojen homologu
<b>RIN:</b>	RNA Integrity Number
<b>RNA:</b>	Ribonükleik asit
<b>Rb:</b>	Retinoblastoma
<b>RPA:</b>	RNaz'dan Koruma Deneyi
<b>rRNA:</b>	Ribozomal ribonükleik asit
<b>RTK:</b>	Reseptör tirozin kinaz
<b>SCC:</b>	Skvamöz hücreli karsinom
<b>TBP:</b>	TATA bağlayıcı protein
<b>TFIID:</b>	Transkripsiyon faktör 2D
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Transforming growth faktör
<b>TGF-<math>\beta</math>-R:</b>	Transforming growth faktör reseptörü
<b>tRNA:</b>	Taşıyıcı ribonükleik asit
<b>Q-PCR:</b>	Kantitatif Real-Time Polşmeraz Zincir Reaksiyonu
<b>XRCC1:</b>	X-ray repair cross complementing 1

## 1.GİRİŞ

Erişkinlerde görülen tüm malignitelerin yaklaşık %2'sini oluşturan larenks kanserleri, baş-boyun bölgesinin en sık görülen malign tümörlerindedir (Lazaris 2000). Ülkelere göre sıklığı değişmekle beraber 2015 yılında Amerika'da yapılan istatistik çalışmasında 13560 (E:10.720, K:2.840) yeni vaka bildirilmiştir. Yeni tanı alan 3640 (E:2890, K:750) vakanın aynı yıl içinde mortalite ile sonuçlandığı raporlandırılmıştır (Siegel 2015). Ülkemizde ise International Agency for Research on Cancer 2012 araştırmalarına göre 1 yılda ortalama 2672'si erkek, 177'si kadın olmak üzere 2849 yeni vaka olduğu, ölen vaka sayısının ise 1080'i erkek, 71'i kadın olmak üzere 1151 olduğu tahmin edilmektedir (Globocan 2012). Bilinen en sık risk faktörleri sigara ve alkol olan larenks kanserlerinin ayrıca asbest, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, kömür, çimento, ahşap tozu gibi toksik ajanlara maruziyet sonrasında da oluştuğu gözlenmiştir (Field 1989, Talamini 2002, Ramroth 2011). En sık görülen histolojik tipi skuamöz hücreli karsinom olan larenks kanserleri lokalizasyonuna göre 3 gruba ayrılır. Vakaların %60-65'i glottik bölgede, %30-35'i supraglottik bölgede, %5'i ise transglottik ve subglottik bölgede görülmektedir (Bayer 2016). Erken dönemde tanı alarak doğru evrelendirilmesi yapılan erken evre larenks kanserlerinde radikal radyoterapi, lazer tedavisi ya da parsiyel larengektomi ile kür sağlanabilmektedir (Rozai 1996).

Tüm malignitelerde olduğu gibi larenks kanserlerinin temelinde de onkogenlerin aktivasyonu ve tümör süpresör genlerin inaktivasyonu gibi çeşitli genetik süreçler yer almaktadır. Bu değişimler hücre siklusunu ve apoptozisini etkileyerek normal hücrelerin kanser hücresine dönüşümüne sebep olurlar (Mendenhall 2004). Baş-boyun bölgesi tümörlerinde en çok çalışılan genetik değişiklikler; tümör süpresör genler olarak bilinen p53 geni ve p16 (INK4) genlerindeki inaktivasyondur. Vakaların üçte birinde görülen siklin D1 amplifikasyonu ve vakaların dörtte birinde görülen EGFR amplifikasyonu ise diğer sık görülen değişimlerdendir. P16 ve p53 genindeki değişimler kanser oluşumunun erken evrelerinde gözlenirken; siklin D1 ve EGFR'deki değişimler ise ileri evrelerde gözlenmiştir (Uzun 2004, Nadal 2003). 3p, 9p, 8p ve 18q kromozom bölgelerinde oluşan delesyon ve mutasyonlar ile myc, ras, neu, bcl ve int onkogenlerinde görülen ekspresyon artışı larenks kanseri oluşumunda etkili olduğu düşünülen diğer değişikliklerdendir (Gleich 2002, Uzun 2004).

Tüm genom ekspresyon analizi son zamanlarda kullanılmaya başlanan ve tüm genomu görme imkanı sağlayan yöntemlerden biridir. Patolojik doku ile normal dokudaki

genlerin ekspresyonlarını karşılaştırarak hastadaki mevcut patolojinin etyolojisinde yer alan sorumlu tüm genlerin belirlenmesini sağlar. Böylelikle erken tanı ve ileri dönemde geliştirilebilecek yeni tedavileri araştırma olanağı sağlar (Li 2014).

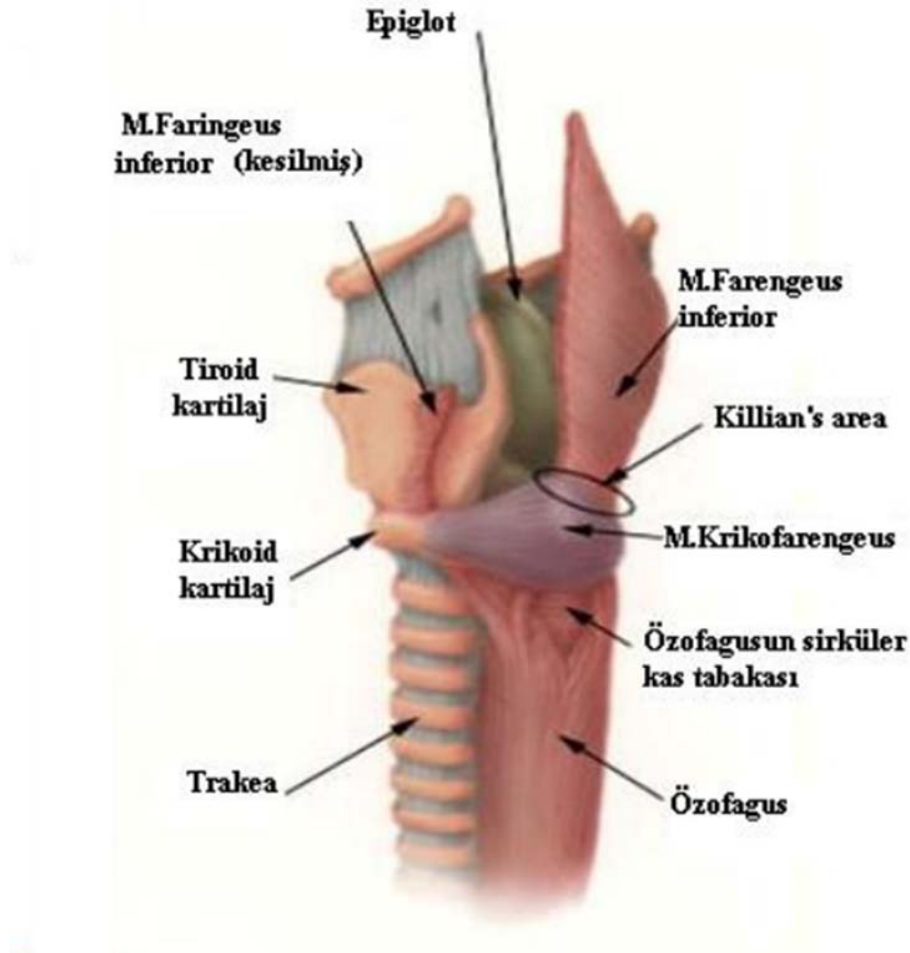
Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda larenks kanserinin etyolojisinde rol aldığı düşünülen genler üzerinde çalışılmış ancak tüm genom bazında araştırma yapılmamıştır. Çalışmamızda larenks kanserli vakalardan alınacak normal ve patolojik doku örneklerinin tüm genom ekspresyon yöntemi ile analizinin yapılarak larenks kanserine sebep olabileceği düşünülen genlerdeki ekspresyon değişimlerine bakılması ve daha önceden etyolojide rol aldığı bilinen genlerin yanı sıra yeni genlerin bulunması amaçlanmıştır. Ayrıca bu yeni genlerin tedavi için yeni biyomoleküller bulunmasına aracı olacağı düşünülmektedir. Böylece, vakaların erken tanı alacağı, aynı zamanda sağkalım sürelerinin de uzayacağı öngörülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Larenksin Yapısı ve Görevleri

#### 2.1.1 Anatomi

Larenks; kıkırdak, kas ve fibroelastik bağlardan oluşan, dil kökü ile trakea arasında ve servikal 3-6 (C3-C6) vertebralar seviyesinde yerleşen, havanın trakeaya giriş ve çıkışını kontrol eden, üst solunum yollarının ses oluşturabilen ve yutma sırasında bir sfinkter gibi görev yapan özelleşmiş önemli bir bölümdür (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Larenks'in genel anatomik görünümü

Larenks başlıca üç bölümde incelenir (şekil 2.2.):

#### -Supraglottik bölüm:

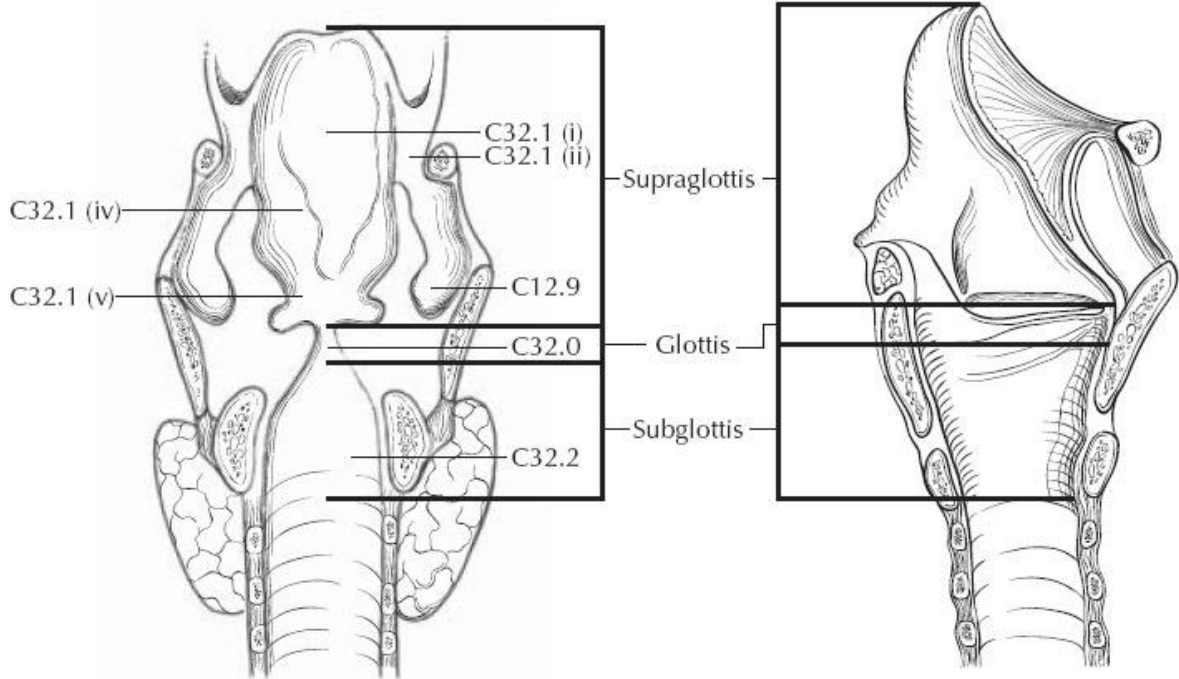
Epiglottun ucundan gerçek korda kadar uzanır. Epiglott, ventriküler bandlar (yalancı kordlar), areoepiglottik plikalar, aritenoid kıkırdaklar ve ventriküller bu bölümde yer alır.

### **-Glottik bölüm:**

Bu bölüm vokal kordlar ve onları önde birleştiren anterior komissürü içine alır.

### **-Subglottik bölüm:**

Gerçek kordların alt sınırı ile birinci trakea kıkırdağı arasında yer alan bölümdür (Kirchner 2004, Rosai 2004).



**Şekil 2.2.** Larenks boşluğu; supraglottik, glottik ve subglottik bölgelere ayrılır (Frederick 2006).

### **2.1.2 Embriyoloji**

Larenks embriyolojik olarak iki farklı yapıdan gelişir. Bukko-farengal tomurcuktan (üçüncü ve dördüncü brankiyal ark) supraglottis, trakeobronşial tomurcuktan (beşinci ve altıncı brankiyal arklardan) ise glottis ve subglottis gelişir. Larenks kıkırdakları postnatal dönemde gelişmeye devam ederek 25 yaş civarında kemikleşmeye başlar ve 65 yaş civarında bu kemikleşme tamamlanır (Meller 1984).

### **2.1.3 Histoloji**

Larenksin epiteli bölgelere göre stratifiye skuamöz epitel ile respiratuar tip silli epitel arasında değişir:

Epiglot: Lingual (ön) yüz → stratifiye skuamöz

Larengal (arka) yüz → stratifiye skuamözden respiratuar tipe doğru değişir.

Larenks: Supraglottik kısım → respiratuar tip

Glottis → stratifiye skuamöz

İnfraglottik kısım → respiratuar tip

Epiteller arası geçiş bölgeleri keskin olabileceği gibi 1-2 mm'lik bir geçiş zonu da içerebilir. Sigara içmeyen erişkinlerin yarısında supra ve infraglottik bölgelerde, respiratuar tip epitelin içinde skuamöz epitel ile döşenmiş bölgeler yer almaktadır. Sigara içenlerde ise larenksin respiratuar epiteli tamamen skuamöz epitelle yer değiştirebilmektedir (Ozcan 2002, Rosai 2004).

#### 2.1.4. Fizyoloji

**Sfinkter fonksiyonu:** Larenks sfinkter fonksiyonu sayesinde yutma sırasında kapanır ve akciğerleri sıvı ve katı gıdaların girişinden korur.

**Solunum fonksiyonu:** İspirasyonun başlaması için nervus larengeus inferiorun uyarılması ile glottik açılma başlar. Sonrasında frenik sinir uyarılır, diyafragma aşağı iner ve inspirasyon gerçekleşir.

**Ses oluşum fonksiyonu ve konuşmada rolü:** Larenksin en ileri fonksiyonu olarak kabul edilir. Konuşma fonksiyonu jeneratör sistem, vibratör sistem ve rezonatör sistemin kombine olarak çalışması ile oluşur.

### 2.2. Larenks Kanseri

#### 2.2.1. Epidemiyoloji

Larenks kanserleri, baş boyun tümörleri arasında üst sıralarda yer almaktadır ve erişkin malignitelerinin de %2'sini oluşturmaktadır (Lazaris 2000). Erkeklerde %2.2, bayanlarda %0.4 görülme sıklığı ile erkek/kadın oranı en yüksek olan kanser tipidir. Kadınlardaki sigara tüketim oranının artışıyla ve kadınların da iş hayatında erkekler kadar toksik ajanlara maruz kalmasıyla aradaki fark azalmaktadır (Rosai 1996). Ülkelere göre sıklığı değişmekle beraber Amerika'da 2015 yılında yapılan istatistik çalışmasında 13560 (E:10.720, K:2.840) yeni vaka bildirilmiştir. Yeni tanı alan 3640 (E:2890, K:750) vakanın ise aynı yıl içinde mortalite ile sonuçlandığı raporlandırılmıştır (Siegel 2015). Ülkemizde ise International Agency for Research on Cancer 2012 araştırmalarına göre 1 yılda ortalama 2672'si erkek, 177'si kadın olmak üzere 2849 yeni vaka olduğu, ölen vaka sayısının ise 1080'i erkek, 71'i kadın olmak üzere 1151 olduğu tahmin edilmektedir (Globocan 2012). Bu oranlarla ülkemizdeki kansere bağlı erkek ölümlerinin %7'sinden sorumludur (Elci 2003). En sık 5–

7. dekadlar arasında görülürken, 30 yaşın altında görülme sıklığı ise %1'dir. Larenks kanserli bir vakada senkron (eş zamanlı) tümör görülme sıklığı %1 iken, metakron(ardışık) primer tümör ihtimali %5-10'dur. Literatürde başka bir tümörle en fazla birliktelik gösteren kanser olarak tanımlanmaktadır (Schwartz 1994, Spector 2001, Gao 2003, Hsu 2008, Farhadieh 2010).

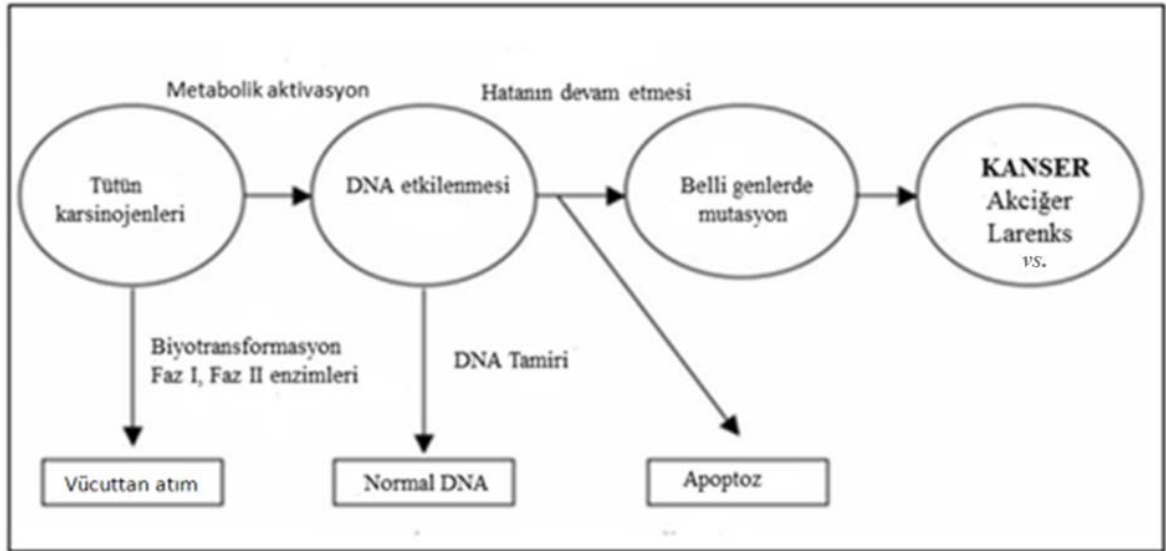
### 2.2.2 Etiyoloji

Larenks kanseri multifaktöryel özellik gösteren bir hastalıktır. Kanserin gelişiminde birçok genetik ve çevresel faktörün birbiriyle etkileşim halinde olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur. Larenks kanser gelişiminde çevresel faktörler arasında başta sigara olmak üzere, alkol tüketimi, human papilloma virüs, gastro-özefageal reflü, toksik ajanlara mesleki maruziyet, diyet ve baş-boyun bölgesine radyasyon alma öyküsü sayılabilir (Parkin 2011). Tüm bu risk faktörlerinin 'genetik materyalde' değişime sebep olarak normal hücreleri malign hücrelere dönüştürdüğü düşünülmektedir.

#### **Sigara:**

Larenks kanseri başta olmak üzere tüm skuamöz hücreli baş boyun tümörlerinin gelişiminde en önemli çevresel risk faktörü sigaradır. Vakaların %79'unda sigara kullanım öyküsü mevcuttur (Parkin 2011). Sigara kullananlarda, kullanmayan bireylere göre larenks kanser görülme sıklığı 8.3 kat artmış olarak bulunmuştur. Özellikle supraglottik ve glottik histolojik tiplerde etkili olduğu bilinen sigaranın kullanım süresi ve başlanma yaşı da kanser sıklığı ile ilişkili bulunmuştur (Wyss 2013). Tütün içerisindeki kansere sebep olan asıl maddenin nikotin olmadığı, aromatik heterosiklik radikaller ve epoksitler gibi metabolik ara ürünler olduğu ortaya konmuştur (Şekil 2.4.). Bu maddelerin vücuttan atımında ve metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan genlerin polimorfizmi, mutasyonu ya da ekspresyon değişiklikleri sigaranın kanser yapıcı etkisinden sorumlu tutulmaktadır (To-Figueras 2002).

Ayrıca yapılan bir çalışmada sigara ve alkol kullanım öyküsü olmayan larenks kanserli vakalar ile bunları kullananlar karşılaştırılmış ve kullanmayan kişilerde, hastalığın 10 yıl daha geç ortaya çıktığı, en sık glottik bölgeye yerleştiği, erkek baskınlığı bulunmadığı ve daha iyi bir sağkalım süresi gösterdikleri saptanmıştır (Agudelo 1997).



**Şekil 2.4.** Tütün karsinojenleri ve metabolitlerinin kanser oluşumundaki rolü (Hecht 2003 kaynağından alınarak yeniden düzenlenmiştir).

#### **Alkol:**

Etkisi sigara kadar kesin olmamakla beraber alkol tüketiminin de doza bağımlı olarak larenks kanser sıklığını artırdığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada içki türünün etkili olmadığını ancak tüketim dozuna bağılı olarak riskin 1,4-5,9 kat arasında arttığı gösterilmiştir (Menvielle 2004). Sigara ve alkol bağımsız risk faktörleri olsalar da beraber tüketimleri durumunda additif etkiden bahsedilmektedir. Literatürde tek başına alkol tüketiminin larenks kanser sıklığını 2.2 kat, yalnız sigara tüketiminin 9.3 kat, sigara ve alkolün birlikte tüketiminin ise 26 kat artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Koufman 1997, Bosetti 2002).

#### **Diyet:**

Kişinin beslenme durumunun larenks kanser sıklığını etkilediğine dair yayınlar mevcuttur. Yetersiz ve dengesiz beslenmenin riski artırdığı; sebze, meyve ve bitkisel yağdan zengin "Akdeniz tipi" diyetin ise riski azalttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Özellikle sigara ve alkol tüketimine bağılı larenks kanseri gelişen vakaların %25-50'sinde beslenme bozukluğundan bahsedilmektedir (Riboli 1996).

#### **Radyasyon:**

Baş-boyun bölgesine herhangi bir sebeple radyoterapi alan bireylerde uygulanan radyoterapinin larenks kanser gelişme riskini artırdığı bilinmektedir (Kaya 2002).

Radyasyonun dozuna, fraksiyonuna ve dağılım oranına bağlı olarak risk değişmektedir (Koufmann 1997).

### **Mesleki maruziyet:**

Toksik ajanlara mesleki maruziyet, larenks kanser gelişimine sebep olan faktörlerden biridir. Vakaların çoğunda polisiklik aromatik bileşiklere, asbeste, nikel, sülfürik asite, formaldehite, izopropil alkole, çimento ve metal tozlarına, asit buharına ve silika tozuna maruziyet söz konusudur. Ahşap mobilya işçileri, şarap üreticileri, kasaplar, fırıncılar ve canlı hayvanlarla iç içe çalışanlar, larenks kanser gelişimi için riskli meslek grupları arasında sayılmaktadır (Wunsch 2004).

### **Human Papilloma Virüs:**

Son çalışmalarla birlikte yaklaşık 200 adet HPV tipi tanımlanmıştır ve her geçen gün listeye yenileri eklenmektedir (Münger 2004). HPV enfeksiyonu başta serviks kanseri olmak üzere birçok kanser tipiyle ilişkili bulunmuştur. Orofarengeal kanserlerin %20'sinde saptanan HPV enfeksiyonu için HPV 6, 11 düşük risk; 31-33 orta dereceli risk; 16, 18 ise yüksek risk olarak tanımlanmıştır (Moore 1999).

### **Gastroözofageal ve Larengofarengeal Reflü:**

Gastroözofageal reflü ve larengofarengeal reflü, sigara ve alkol kullanım öyküsü olmayan larenks kanser vakalarında tek başına larenks kanser etiolojisinden sorumlu tutulmaktadır. Dağlı (2004) ve arkadaşları 22 larenks kanserli vaka üzerinde yaptıkları bir çalışmada larengofarengeal reflünün larenks kanserli bireylerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (kanseri vakalarda % 63.6, kontrol grubunda %20, p:0.003) (Dağlı 2004).

### **2.2.3. Histopatoloji**

Larenks kaynaklı tümörlerin %95'ini skuamöz hücreli kanserler oluşturur. Karsinoma in situ, verrüköz tümörler, undiferansiye karsinom, adenokarsinom, adenoid kist, nöroendokrin karsinom ve sarkomalar ise malign larenks tümörlerinin %1'inden daha azını oluşturur (Batsakis 1992). Benign tümörler ise yaklaşık %5 oranında görülür ve en sık rastlanan benign tümörler papillomlardır (%85). Kondrom, hemanjiom, lenfanjiyom, nörofibrom, adenom, leiomyom, rabdomyom ve lipom görülen diğer benign tümörlerdendir.

Skvamöz hücreli karsinom lokalizasyonuna göre 4 alt tipe ayrılır: bunlar supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik tiptir. Tümörlerin yaklaşık %50-60'ı glottik bölge kaynaklı iken, bunu %30-40 oranla supraglottik bölge izler. Subglottik alanda ise tümörlerin %5'inden daha azı görülür (Mastronikolis 2009).

**Supraglottik kanserler;** epiglotun serbest kenarından vokal kordlara kadar uzanan alanda ortaya çıkan tümörlerdir. Bölge lenfatiklerden zengindir ve bu nedenle tümör yayılımları kolaydır. Preepiglotik alana ve troid kıkırdağa da yayılabildiklerinden prognozları kötüdür. Hastalarda ses kısıklığından çok boğaz ağrısı semptomunun olması tanıyı geciktirir. Ses kısıklığı şikayeti tümörün transglottik hale geçtiğini ve daha agresif seyredeceğini gösterir.

**Glottik kanserler;** vokal kord, ön ve arka komissürü tutan tümörlerdir. En sık glottisin 1/3 ön kısmında görülür. Lenfatikten fakir bir bölgedir. Glottik bölge tümörlerinde ses kısıklığı erken dönemde ortaya çıktığı için vakalar erken tanı alırlar. Genellikle iyi diferansiye olan glottik tümörlerin prognozu iyidir.

**Subglottik kanserler;** vokal kordun yaklaşık 5 mm aşağısından başlayan ve krikoid kıkırdak alt sınırına kadar uzanan tümörlerdir. Ekzofitik büyümeleri sebebiyle hava yolu tıkanıklığı bulgusu verirler. Genelde troid bezini invaze ederler. Subglottik bölge tümörlerinin %15-20'si servikal lenf nodlarına dağılırken, %50'si ise paratrakeal lenf nodlarına metastaz yapar. Bu nedenle ameliyat sırasında paratrakeal lenf nodlarının da çıkarılması önerilir (Rosai 2004).

**Transglottik kanserler;** supraglottik ya da subglottik bölgeyi tutan ve ventrikülü vertikal olarak geçen kanserlerdir. Paraglottik alana yayılabildiklerinden prognozları kötüdür.

Tümörün yerleşim yerine bakılmaksızın, larenks kanserinin en sık metastaz yaptığı yerler bölgesel lenf nodları ve akciğerken, lokal olarak en sık tiroid bezine ve jugüler vene dağılır (Rosai 2004).

#### **2.2.4. Evreleme**

American Joint Committee on Cancer'nin (AJCC) 2002 yılında yayınladığı kılavuza göre, larenks kanserlerinin evrelemesi: Tümör veya T evrelemesi, larenksin horizontal alanlarına göre yapılır. Nodal metastaz veya N evrelemesi nod boyutuna ve sayısına göre yapılır. M evrelemesi veya uzak metastaz ise boyun ve larenks dışındaki lezyonu gösterir.

<b>T- Primer Tümör</b>
<b>Tx:</b> Primer tümör değerlendirilemiyor
<b>T0:</b> Primer tümör bulgusu yok
<b>Tis:</b> Karsinoma in situ
<b>Supraglottis</b>
<b>T1:</b> Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, vokal kord hareketleri normaldir.
<b>T2:</b> Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını/glottisi/supraglottis dışındaki bir bölgeyi tutmuştur, vokal kord hareketleri normaldir.
<b>T3:</b> Vokal kord tutulumu ve/veya postkrikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invaze ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu (iç korteks) mevcuttur ancak tümör larenks içinde sınırlıdır.
<b>T4a:</b> Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrensik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
<b>T4b:</b> Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.
<b>Glottis</b>
<b>T1:</b> Tümör vokal kordlarla sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir).
<b>T1a:</b> Tümör tek bir vokal korddadır.
<b>T1b:</b> Tümör her iki vokal korddadır.
<b>T2:</b> Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmaktadır ve/veya kord hareketleri kısıtlanmıştır.
<b>T3:</b> Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte vokal kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu vardır (iç korteks).
<b>T4a:</b> Tümör tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrensik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
<b>T4b:</b> Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

<b>Subglottis</b>
<b>T1:</b> Tümör subglottise sınırlıdır.
<b>T2:</b> Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.
<b>T3:</b> Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır.
<b>T4a:</b> Tümör krikoid veya tiroid kıkırdağı tam kat invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin dış kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumusak dokuları).
<b>T4b:</b> Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiş veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.
<b>N- Bölgesel Lenf Nodları</b>
<b>Nx:</b> Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.
<b>N0:</b> Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.
<b>N1:</b> En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır.
<b>N2:</b> En büyük çapı 3–6 cm arasında tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır veya hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır veya hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontralateral lenf nodların da metastaz vardır.
<b>N2a:</b> En büyük çapı 3–6 cm arasında tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır.
<b>N2b:</b> Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır.
<b>N2c:</b> Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz vardır.
<b>N3:</b> Bir lenf nodunda 6 cm' den büyük metastaz vardır.
<b>M - Uzak Metastaz</b>
<b>Mx:</b> Uzak metastazlar değerlendirilememektedir.
<b>M0:</b> Uzak metastaz yoktur.
<b>M1:</b> Uzak metastaz vardır.

**Tablo 2.** Evrelendirme tablosu (American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2002'ye göre düzenlenmiştir)

<b>EVRE</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Evre I</b>	<b>T1</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Evre II</b>	<b>T2</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Evre III</b>	<b>T3</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
	<b>T1</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T2</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T3</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
<b>Evre IVA</b>	<b>T4a</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
	<b>T4a</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T1</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
	<b>T2</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
	<b>T3</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
	<b>T4a</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
<b>Evre IVB</b>	<b>T4b</b>	<b>Herhangibir N</b>	<b>M0</b>
	<b>Herhangibir T</b>	<b>N3</b>	<b>M0</b>
<b>Evre IVC</b>	<b>Herhangibir T</b>	<b>Herhangibir N</b>	<b>M1</b>

### 2.2.5. Larenks Kanseri Genetiği

Tüm kanserlerde olduğu gibi larenks kanserlerinin temelinde de onkogenlerin aktivasyonu, tümör süpresör genlerin inaktivasyonu, immortalizasyon ve invazyon gibi hücre siklusunu ve apoptozisini etkileyen çeşitli genetik süreçler yer alır. Bu değişimler, normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşümüne sebep olur (Mendelhall 2004). Larenks kanseri oluşumuna sebep olduğu düşünülen genetik değişikliklerden bazıları şunlardır:

#### *Sitogenetik Değişimler*

Larenks kanseri başta olmak üzere baş boyun kanserlerinde en çok değişime uğrayan kromozomal bölgeler; p16 genini içeren 9p21 bölgesi, CCND1 lokusunu içeren 11q13 bölgesi, p53 genini içeren 17p13 bölgesi, en az 3 tümör süpresör genin yerleştiği düşünülen 3p bölgesi, 13q21, 8 ve 6p bölgeleridir. 9p21, 17p13 ve 3p bölgelerindeki

heterozigosite kaybı (LOH) larenks kanserinin erken evrelerinde görülürken; 13q21, 11q13 ve 8 nolu kromozom değişimleri daha çok tümörün ileri evrelerinde karşımıza çıkmaktadır (Almadori 2004).

### ***Moleküler Değişimler***

#### **Onkogenler**

##### **Epidermal growth faktör reseptörü (EGFR)**

EGFR, ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi ve intraselüler protein tirozin kinaz aktivasyon bölgesi bulunan, tüm membran boyunca uzanan bir reseptördür. Reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesinin en önemli üyesidir. Ligandın bağlanması ile başka bir EGFR ile homo ya da heterodimer oluşturan reseptör, tirozin kinaz fosforilasyonu aracılığıyla hücre yüzeyine gelen bilginin çekirdeğe ulaşmasını sağlamaktadır. EGFR aracılı sinyaller hücre proliferasyonu, neoanjiyogenezis, hücre migrasyonu ve metastaz yönünde etkilidir. Bu durum hücrelerde apoptozisi ve farklılaşmayı önleyerek kanser oluşumuna zemin hazırlamaktadır (O-charoenrat 2002).

EGFR geni larenks kanserli vakaların %13'ünde amplifiye olarak bulunmuştur. Ayrıca EGFR genindeki yüksek seviyelerin kanserin lenf nodu metastazında etkili olduğu bilinmektedir (Irish 1993, Almadori 1999). Bu nedenle EGFR, larenks kanserinin moleküler karakterizasyonu ve agresivitesinin belirlenmesinde kullanılan en güvenilir biyolojik belirteçlerden biri olma özelliğini halen korumaktadır (Mastronikolis 2008).

##### **Siklin D1**

PRAD1 onkogeni tarafından kodlanan siklin D1 proteini, hücre döngüsünde CDK4 ile kompleks halindedir ve G1-S geçiş noktası için önemlidir. Baş-boyun tümörlerinde sıklıkla amplifiye olarak karşımıza çıkan siklin D1 geni, 11q13 bölgesinde lokalizedir. Bu bölgede yerleştiği düşünülen başka onkogenler de vardır ancak yalnızca siklin D1 overekspresyonu larenks kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum kanserin ileri evrelerinde karşımıza çıkmaktadır ve kötü prognozla ilişkilidir (Jares 1994). Siklin D1 artışı ile birlikte CDK4 artışı bulunan vakalarda ise prognoz daha kötüdür (Dong 2001).

##### **Siklin E**

Larenks kanserlerinin önemli bir kısmında overeksprese olarak bulunan siklin E başlıca supraglottik tümörlerde karşımıza çıkmaktadır ve kötü prognoz belirteçidir (Dong 2000).

## **Ras**

Larenks kanserli vakalarda oldukça nadir görülen Ras mutasyonları daha çok oral kanserlerle ilişkili bulunmuştur. Ancak Yarbrough (1994) ve arkadaşları tarafından baş-boyun tümörüne sahip bireylerle yapılan bir çalışmada ras overekspresyonundan bahsedilmektedir (Yarbrough 1994).

## **c-myc**

c-myc, hücre proliferasyonu ve apoptozis yollarındaki genleri düzenleyen transkripsiyon faktörüdür. Daha çok B hücreli lenfoma gelişiminde rolü olduğu bilinen c-myc'nin, 23 larenks kanserli vaka ile yapılan çalışmada 3 vakada amplifiye olduğu gösterilmiştir ancak mRNA overekspresyonu gözlenmemiştir. Bu nedenle c-myc geninin larenks kanser gelişiminde major rol oynamadığı düşünülmektedir (Dolcetti 1991).

Yukarıda bahsedilen onkojenik faktörlerin yanı sıra bazı gen ve enzim aktivitelerinin de onkogeneze etkili olduğu düşünülmektedir (Mastronikolis 2008).

**a) Telomeraz aktivitesi :** larenks kanser hücrelerinin çoğunda telomeraz aktivitesi artmış olarak bulunmuştur. Hücrelerin bir kısmında aktivite artışının h-TERT gen overekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

**b) HPV:** p53, pRb gibi önemli tümör supresör genleri degrade ve inhibe ederek; EGFR, siklin A ve B gibi onkogenleri ise aktive ederek karsinojenik aktivasyon göstermektedir.

**c) Ki67, PCNA:** proliferasyon markerlarıdır ve aşırı ekspresyonları lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur.

**d) MMP (Matriks metalloproteinazlar), Hiyaluronidaz ve Katepsin d:** ekstrasellüler matriksi parçalayan enzimlerdir. Aşırı ekspresyonları tümör büyümesi, invazyon, metastaz ve anjiogenezis ile ilişkilidir.

**e) COX-2 (siklooksijenaz tip 2) ve bcl2:** apoptozisi baskılayarak karsinojenik etki gösterirler. Ayrıca COX 2'nin neoanjiyogenezini indükleyerek tümör yayılımını kolaylaştırdığı bilinmektedir. Düşük COX-2 ekspresyonunun kötü diferansiyasyon, yüksek agresivite ve invazivite ile ilişkili olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur.

**f) C-erbB2:** EGFR ailesinden olan c-erbB2, larenks kanserinin ileri evresinde overeksprese olarak karşımıza çıkmaktadır ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir.

## **Tümör Süpresör Genler**

### **Retinoblastoma**

Famlyal ve sporadik retinoblastoma vakaları arasındaki farklılıkların temelinde tanımlanan ilk tümör supresör genidir. Retinoblastoma geni 13q bölgesine lokalizedir. Baş boyun kanserlerinde 13q lokusunun allelik kaybından sıklıkla bahsedilmekte ancak bu durum retinoblastoma gen ekspresyonunu etkilememektedir (Rafferty 2008). Bu uyumsuzluk, retinoblastom lokusu yakınlarında başka tümör supresör genlerin olabileceğini ve lokustaki allelik kaybın hedefinin bu bölge olabileceğini düşündürmektedir. Paratroid, over, akciğer, mesane, özefagus, böbrek ve meme kanseri gibi kanserlerde de 13q allelik kaybına sıklıkla rastlanması, bu bölgede birden fazla tümör süpresör gen olduğu düşüncesini desteklemektedir (Yoo 1994, Pietruszewska 2008).

### **P53**

Nükleer fosfoprotein olan p53; transkripsiyon, DNA sentez ve tamiri, hücre döngü kontrolü ve apoptozis gibi yollarda görev alan bir tümör süpresör genidir. P53 gen mutasyonu ya da p53'ün MDM2 ve E6 gibi hücrel proteinler tarafından yıkımı, p53 fonksiyon kaybına yol açan mekanizmalardandır. P53 fonksiyon kaybında yalnızca larenks kanser sıklığı değil, tüm baş-boyun kanserlerinin sıklığı artar (Mastronikolis 2008). P53 geni baş-boyun kanserlerinde %50 oranında mutasyona uğramaktadır (Şimşek 2014). Overekspresyon varlığı ise ilk olarak 1992 yılında immunohistokimyasal boyalarla larenks dokusunda gösterilmiştir. Yüksek p53 ekspresyonu, larenks kanserli vakaların %60'ında rapor edilmiştir ve bu yüksek değerler p53 gen mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda larenksin skuamöz hücreli kanserlerinde p53 gen mutasyonlarının ve p21 ekspresyonunun prognostik önemini araştıran çalışmalar mevcuttur ancak bu çalışmalarda p53 geni ile tümör evresi ve farklılaşması arasında ilişkisi bulunamamıştır. Jeannon ve arkadaşları 114 larenks displazili hasta ile yaptıkları çalışmada, p53 ve p21 ekspresyonu ile displazi derecesi veya larenks kanser riski arasında ilişki saptamamıştır (Jeannon 2004). Bu durum p53 gen mutasyonunun karsinogenezin sadece ilk aşamalarında etkili olduğunu düşündürmektedir.

### **P21**

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CPKIs) p21, hücre döngüsünü kontrol eden protein ailesinin bir parçasıdır ve mitoz bölünmenin G0 dinlenme fazından, G1 fazına aşamalı geçişine aracılık eder. P21'in apoptozis, hücre siklus durdurulması gibi bazı tümör

supresör etkileri düzenlediği de düşünülmektedir. P21 over-ekspresyonu larenks kanserli vakaların büyük çoğunluğunda karşımıza çıkmaktadır. Peschos ve ark.'nın yaptıkları çalışmada bu oran %58,9 olarak bulunmuştur. P21 ekspresyonu, tümör hücre farklılaşmasıyla yakından ilişkilidir. Kötü differansiye tümörlerde, normal mukozaya göre p21 ekspresyonu düşük olarak bulunurken, bu durumun p53 inaktivasyonundan bağımsız olduğu da bildirilmektedir (Nadal 1997). Kanser hücrelerinde p21, siklin D ve E arasında güçlü pozitif bir ilişki mevcuttur. Ayrıca yüksek proliferatif agresif tümörlerde, siklinlerle p21'in koekspresyon gösterdiği de rapor edilmiştir (Peschos 2004).

### **p16**

INK4 inhibitör kinaz ailesinden olan p16, CDK4'e bağlanarak CDK4-siklin D1 kompleks oluşumunu önler. 9p21 bölgesine lokalize olan p16 geni, baş-boyun tümörlerinde sıklıkla delesyona uğrar (Cardesa 2006). P16 geni; mutasyon, homozigot delesyon ve promotor hipermetilasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla inaktivasyona uğrar. 46 larenks skuamöz hücreli karsinoma sahip vaka ile yapılan bir çalışmada, vakaların %22'sinde p16 geninde mutasyon ya da homozigot delesyon, %7'sinde promotor hipermetilasyonu ve %57'sinde ise 9p21 bölgesinde heterozigotluk kaybı (LOH) saptanmıştır. Heterozigosite kaybı; ilerlemiş lokal invazyon, lenf nodu metastazı, evre 4 tümör ve siklin D amplifikasyonu ile korele olarak gösterilmiştir. Mutasyona sahip vakalara p16 ekspresyonu açısından bakıldığında ise kanser dokularında, normal larenks dokusuna göre p16 geninin ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur (Jares 1997). Şimşek ve arkadaşlarının larenks skuamöz hücreli karsinoma sahip vakalarla yaptığı çalışmada kanserin erken evrelerinde p16 gen ekspresyonu artmış olarak saptanmıştır ancak bu durum kötü prognozla ilişkilendirilmemiştir (Şimşek 2014).

### **Transforming growth faktör reseptörü(TGF-β-R)**

Transforming growth faktör β(TGF- β) ve TGF- β reseptörü, hücre büyüme kontrolü ve doku yenilenmesi gibi yollarda görev alan moleküllerdendir. Larenks kanser oluşumundaki etkileri tartışmalı olup, kanserli dokuda ekspresyon kaybından bahseden yayınlar olduğu gibi, anlamlı derecede azalmanın olmadığını bildiren yayınlar da mevcuttur. Skuamöz hücreli larenks kanserli 15 vaka ile yapılan bir çalışmada TGFBR ekspresyonunun erken evre larenks kanserinde azaldığı belirtilmektedir. Burada altta yatan mekanizmanın ise TGFBR'ya bağlı hücre büyüme inhibisyonunun ortadan kalkması olduğu düşünülmektedir (Franchi 2001).

## CD44

CD44, hücre-hücre etkileşimi ve hücre adezyonunda major rol oynayan moleküldür. CD44 ekspresyon kaybında; kanser hücreleri, komşu hücrelerden ayrılarak uzak dokulara gidebilmekte ve metastaz gerçekleşmektedir. Bu nedenle CD44 ekspresyon kaybı larenks kanserinde kötü prognoz belirteçidir (Esteban 2005).

### *Diğerleri;*

**S100A2:** son zamanlarda tanımlanan bir tümör süpresördür. Düşük ekspresyonu kötü tümör farklılaşmasıyla ilişkilendirilmektedir. **Tip 2 Östrojen Bağlanma Bölgesi (EBS):** normalde larenks mukozasında bulunur. Tamoksifen ve kuersetin tarafından tümör büyümesinin inhibisyonuna aracılık eder. Larenks kanserindeki ilaç tedavilerinin olası hedeflerindedir. **Galectin 3:** hücre-hücre etkileşiminde görev alan bir moleküldür. Yüksek düzeydeki ekspresyonlarının metastazı önlediği ya da geciktirdiği bilinmektedir (Mastronikolis 2009). Tütün karsinojenlerini metabolize edici enzimlerdeki değişimlerin de solunum yolu kaynaklı kanser riskini etkilediği bilinmektedir. **Arylamine N-asetiltransferaz, insan OGG1 DNA tamir enzimi, CYP1A1, XRCC ve glutathione S transferaz** enzimlerindeki polimorfizmlerin larenks skuamöz hücreli kanser riskini artırdığını bildiren yayınlar mevcuttur (Mastronikolis 2008).

### 2.3. Gen Ekspresyonu

Canlıların çoğunun genetik materyali deoksiribonükleik asit (DNA)'tir. Temelini şeker, fosfat tekrarları ve nükleotid baz çiftlerinin oluşturduğu, birbirini tamamlayıcı ikili sarmal yapıda uzun bir polimerdir. Nükleotidlerin farklı diziler halinde sıralanması ile genetik bilgi oluşur ve bireyin taşıdığı tüm genler “genom” olarak adlandırılır.

Canlıların bir kısmında genetik materyal ise RNA'dır. Azotlu baz, riboz şeker ve fosfattan oluşan RNA, DNA'dan farklı olarak tek sarmalıdır ve bu nedenle de daha kararsız yapıya sahiptir. RNA molekülü, DNA'nın proteine dönüşümündeki çeşitli süreçlerde görev alır (Lüleyap 2008).

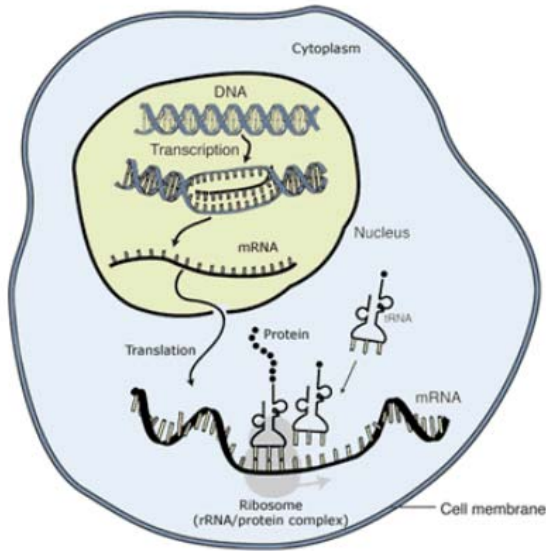
### 2.3.1. Santral Dogma

Gen ekspresyon süreci başlıca 2 aşamadan oluşur : transkripsiyon ve translasyon  
Santral dogma: *DNA -transkripsiyon--> RNA -translasyon--> Protein* (Şekil 2.4.)

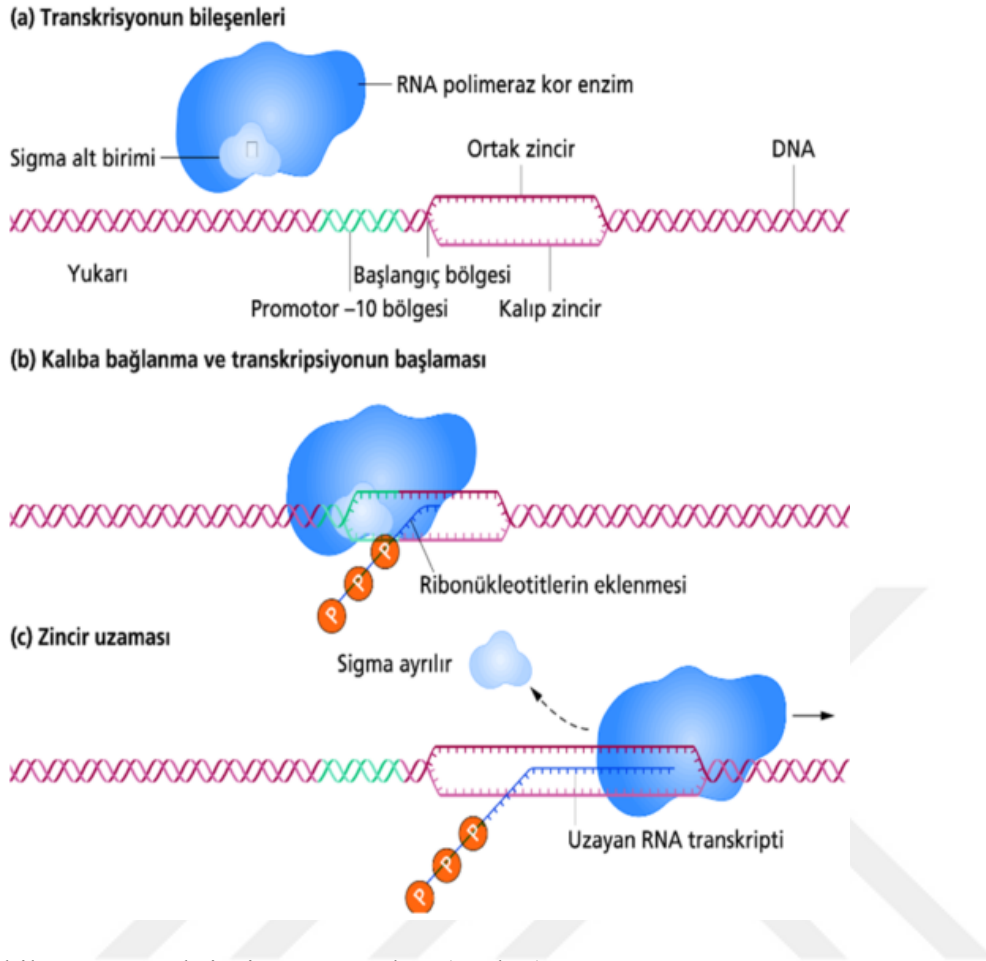
### 2.3.2. Transkripsiyon

DNA'daki genetik bilginin RNA polimeraz enzim aracılığıyla mRNA'ya aktarılmasıdır. Bazı genler ise translasyon aşamasında görev yapmak üzere tRNA ve rRNA moleküllerine dönüşür. Transkripsiyon başlıca 3 evreden oluşur (Lüleyap 2008) (Şekil 2.5.):

- 1- Başlama
- 2- Uzama
- 3- Sonlanma



Şekil 2.4. Santral Dogma (National Human Genome Research Institute)

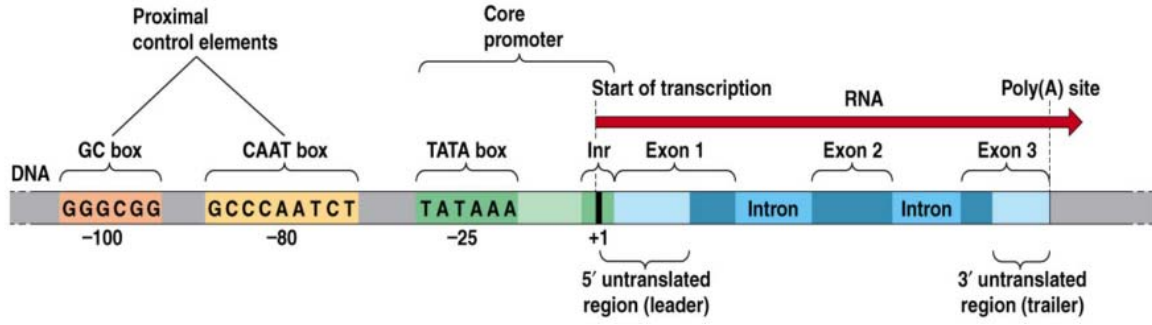


Şekil 2.5. Transkripsiyon aşamaları (Web 1)

**Başlama:** DNA sarmalı çözülerek küçük bir başlangıç kompleksi oluşturur ve RNA polimeraz II, sigma alt birimi ile kalıp DNA'da bulunan promotora bağlanır. RNA polimeraz II'nin etkin biçimde transkripsiyona başlamasını sağlayan cis-acting ve trans-acting düzenleyiciler vardır. TATA kutusu, CAAT kutusu ve enhancerlar cis-acting düzenleyiciler iken, transkripsiyon başlamasına yardımcı olan transkripsiyon faktörleri trans-acting düzenleyicilerdendir (Şekil 2.6.).

- **TATA kutusu:** transkripsiyon başlama bölgesinin 30 nükleotid proksimalinde bulunur. Sarmalın çözülmesini kolaylaştırarak transkripsiyon başlangıç bölgesinin belirlenmesine yardımcı olur.

- **CAAT kutusu:** transkripsiyon başlama bölgesinin 80 nükleotid proksimalinde, promotörün içinde bulunur. TATA kutusu ile birlikte promotör verimliliğini artırır.



Şekil 2.6. CAAT ve TATA kutusu (Web 2)

- **Enhancer:** RNA polimeraz'ın kalıba bağlanmasında doğrudan görevi yoktur ancak transkripsiyonun etkinliğinde rol oynar. Genin 5', 3' ucunda ya da gen içerisinde bulunabilir. DNA'nın 3 boyutlu yapısı sayesinde gen bölgesinin çok uzağında yerleşimli enhancerlar gen ile etkileşerek transkripsiyonu düzenleyebilir.

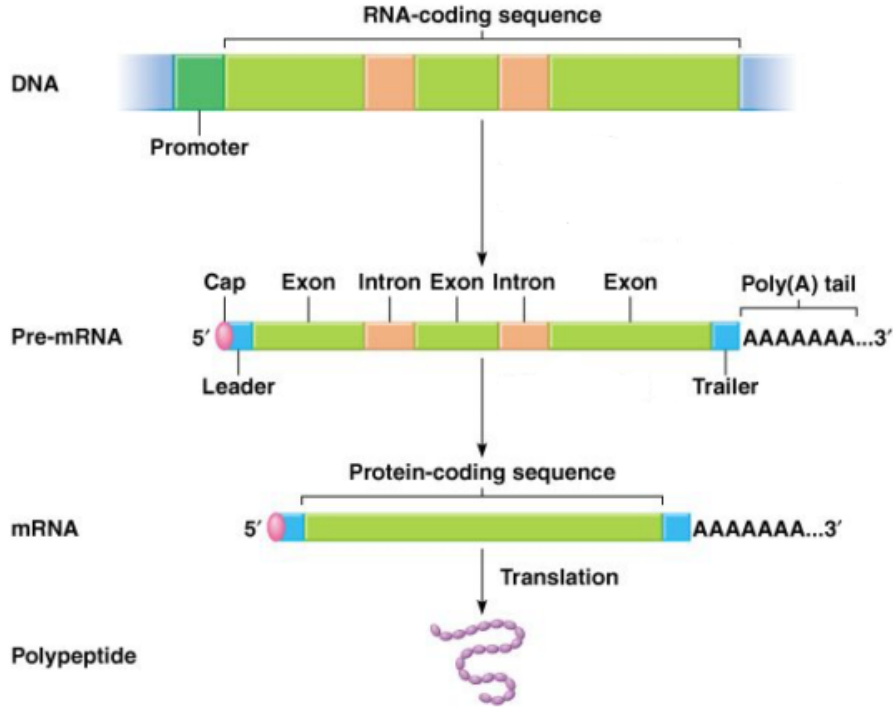
-**Transkripsiyon faktörleri:** RNA polimeraz, kalıp DNA'ya doğrudan bağlanamaz. Transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını takiben promotora bağlanabilen RNA polimeraz enzimi transkripsiyonu başlatır. Kalıp DNA'ya bağlanan ilk transkripsiyon faktörü TFIID'dir. 7 alt birimden oluşan TFIID'nin alt birimlerinden biri de TBP (TATA binding protein)'dir. TFIID, TBP sayesinde kalıp DNA'ya bağlanır. Bu süreci takiben diğer transkripsiyon faktörleri de ortama gelir. TFIIF, ATP hidrolizi yaparak, kalıp DNA'nın çözülmesini kolaylaştırır ve RNA polimerazı fosforiller. Fosforillenen RNA polimeraz konformasyonel değişime uğrayarak senteze başlar.

**Uzama:** RNA zincirindeki son nükleotidin 3' OH grubu ile, yeni eklenen nükleotidin 5' fosfat grubu arasında fosfodiester bağı oluşarak uzama gerçekleşir.

**Sonlanma:** RNA polimeraz kalıp DNA üzerindeki sonlandırma dizilerini tanır ve uzayan mRNA kararsız yapıya geçerek kalıp DNA zincirinden ayrılır. Bitiş noktaları timin nükleotidi bakımından zengindir.

Sentezi tamamlanan mRNA bazı aşamalardan geçtikten sonra stoplazmaya gönderilir. Bu süreç, mRNA'yı daha kararlı hale getirerek stoplazmada yıkımdan kurtarır. Bu aşamalar şu şekildedir (Şekil 2.7.);

- 1- Poliadenilasyon: mRNA 3' ucuna poliadenilat grubunun eklenmesi
- 2- Şapkalama: RNA 5' ucuna 7 metil guanozin eklenmesi
- 3- RNA Splicing: intronların yapıdan çıkarılarak ekzonların bir araya getirilmesi



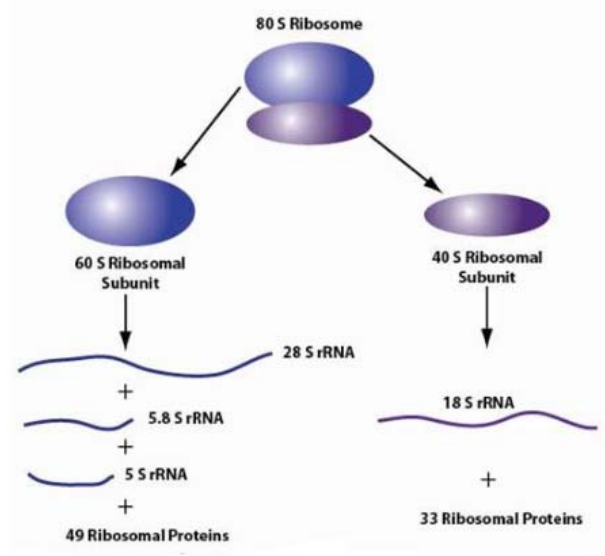
Şekil 2.7. mRNA işlenmesi (Peter J. Russell, iGenetics: Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 18.03.2016)

### 2.3.3. Translasyon

Stoplazmaya geçen mRNA *translasyon* aşamasına geçer. Bu aşamada, DNA'dan mRNA'ya aktarılan genetik bilgi protein haline çevrilir. Translasyon aşamasında görevli esas organel ribozomdur. Ribozom, ökaryotlarda 60S ve 40S olmak üzere 2 alt birimden oluşur; 28S + 5.8S + 5S → 60S alt birimi → büyük alt birim,

18S → 40S alt birimi → küçük alt birim (Şekil 2.8.)

Büyük alt birim, peptit bölgesi (P) ve aminoasit bağlanma bölgesi (A) olmak üzere 2 fonksiyonel birimden oluşur.



Şekil 2.8. Ökaryotik canlılarda ribozomun yapısı (Web 3)

Translasyon süreci başlıca 3 aşamadan oluşur (Lüleyap 2008, şekil 2.9.):

- 1- Başlama
- 2- Uzama
- 3- Sonlanma

#### **Başlama:**

İlk olarak proteinin yapısına katılacak aminoasitler tRNA sentetaz enzimi tarafından 1 ATP enerji harcanarak tRNA'lara yüklenir. Çeşitli ökaryotik başlangıç faktörleri mRNA'yı ribozom küçük alt birimine taşır. Ribozom küçük alt birimi(40S), mRNA 5' ucundaki 7 metil guanozin başlığını tanır ve mRNA'yı AUG başlangıç kodonuna kadar tarar. Ribozom küçük alt birimi AUG kodonuna ulaştığında, ortama ribozom büyük alt birimi, başlangıç aminoasiti olan metionin ve tRNA gelir. Böylece başlangıç kompleksi oluşur.

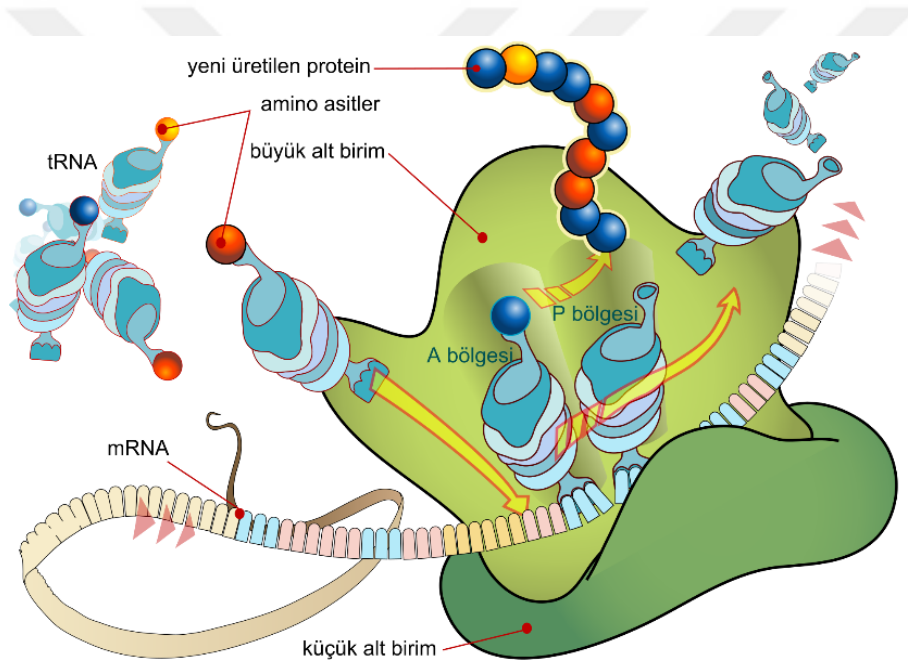
#### **Uzama:**

Translasyon sürecinde mRNA daima 5'- 3' yönünde okunur ve sentez daima amino ucundan karboksil ucuna doğru gerçekleşir. İlk olarak ribozomun büyük alt ünitesinde bulunan P bölgesine metionin taşıyan tRNA yerleşir. A bölgesine ikinci kodona ait uygun aminoasiti taşıyan tRNA gelir ve GTP harcanarak 2. aminoasit de polipeptit yapısına katılır. A bölgesine tRNA'nın gelmesiyle konformasyonel değişime uğrayan ribozom iki aminoasiti birbirine yaklaştırarak aralarında peptid bağı oluşumunu sağlar. Ribozom bu

aşamadan sonra mRNA üzerinde bir kodon ilerler ve A bölgesindeki polipeptit zincir P bölgesine kayar. Böylece A bölgesi 3. aminoasitin yapıya eklenmesi için uygun hale gelir. Stop kodonuna kadar polipeptit zincir uzaması devam eder.

### Sonlanma:

Ribozom, stop kodonuna kadar uzamayı devam ettirir ancak hücrede terminasyon sinyallerine uygun aminoasit taşıyan tRNA yoktur. Bunun yerine sonlanmayı sağlayan ayırma faktörleri (release faktörler-RF) vardır. Ayırıcı faktörler, A bölgesindeki sonlandırıcı kodona bağlanarak P bölgesindeki tRNA ile polipeptit zincir arasındaki bağın hidrolizini uyarır. Böylece tRNA serbest kalır, kalıp mRNA ve ribozom alt üniteleri birbirinden ayrılır.



Şekil 2.9. Translasyon mekanizması (Web 4)

Yukarıda bahsettiğimiz mekanizmalar sonucunda DNA'daki mevcut bilgi önce mRNA'ya daha sonra da proteine çevrilir ve böylece gen ekspresyonu süreci tamamlanır. Bazı durumlarda gen ekspresyonu artarken, bazen de ekspresyon kaybı gözlenebilmektedir. Ekspresyon değişimlerinin gözlemlendiği patolojik süreçlerin başında da kanser gelmektedir. Onkogenler, tümör süpresör genler, apoptozis yolağında ve DNA tamir mekanizmasında görev alan genler başta olmak üzere birtakım gen ekspresyon değişimleri malignite ile sonuçlanabilmektedir. Onkogen özelliğindeki genlerin ekspresyon artışı ve/veya tümör

süpresör genlerin ekspresyon kaybı malignite oluşum yönünde etkili olan temel mekanizmalardandır.

Çalışmamızda; larenks kanserli vakaların normal ve patolojik doku örneklerindeki tüm genom ekspresyon değişimleri analiz edilerek, kanserli dokuda normal dokuya göre ekspresyonu artan/azalan genlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.



### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırmanın Tipi**

Araştırma prospektif vaka-kontrol klinik çalışmadır.

#### **3.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı**

Hasta grubu, 2015 yılında Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı ve Karatay Üniversitesi Medicana Tıp Fakültesi Polikliniği'ne başvuran ve yapılan patolojik tetkikler sonucunda larenks kanser tanısı alan hastalardan oluşmaktadır ve kontrol grubu olarak da aynı hastaların normal larenks dokuları seçilmiştir.

#### **3.3. Araştırma Evreni ve Yeri**

Bu araştırmada, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Ana Bilim Dalı ve Karatay Üniversitesi Medicana Tıp Fakültesi Polikliniği'ne başvuran larenks kanser hastaları araştırma evrenini oluşturmaktadır. Araştırma uygulamasının bir bölümü Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bünyesindeki Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinin Moleküler Genetik laboratuvarında, bir kısmı ise özel bir tanı merkezinde yapılacaktır.

#### **3.4. Örneklem Seçme Kriterleri**

Hasta grubunda;

- Klinik muayene ve patolojik inceleme sonucunda larenks kanser tanısı almak
- Herhangi bir sebeple radyoterapi veya kemoterapi almamış olmak
- Araştırmaya katılmaya gönüllü olmak

Kontrol grubunda;

- Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireyler aynı kişilerdir.

#### **3.5. Çalışma Gruplarının Randomizasyonu**

Araştırmanın yapıldığı bölgede örneklem seçme kriterlerine uygun ilk belirlenen 12 larenks kanser hastası ve kontrol grubu olarak da 12 larenks kanser tanılı hastanın normal larenks dokuları araştırma kapsamına alınmıştır. Araştırmaya dahil edilen tüm bireylerin uygulama aşaması aynı anda başlatılmıştır.

### **3.6. Araştırma Öncesi Bilgilendirme**

Hasta/kontrol grubuna öncelikle araştırmaya dahil olma kriterleri anlatılmıştır. Kriterlere uygun bireylere, ameliyat sırasında patolojiye gönderilmek üzere alınan tümörlü dokudan ve larenks dokusuna ait normal dokudan örnek alınacağı ve bu dokulardan ortaya çıkan gen ürünlerine bakılarak hastalığa sebep olabilecek yeni genlerin bulunmasının amaçlandığı belirtilmiştir. Çalışmanın tamamen gönüllülük esasına dayandığı ve doku örneği verseler dahi istedikleri zaman çalışmadan çıkabilecekleri özellikle ifade edilmiştir. Gerekli bilgiler verildikten sonra çalışmaya katılmak isteyen ve kriterlere uyan bireylere gönüllü onam formları okutulup imzalatılmıştır (Bkz. Ek 1).

### **3.7. Araştırmanın İzni ve Etik Durum**

Araştırmaya başlamadan önce Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'ne bağlı Etik Kurul komisyonuna yapılacak tüm işlemleri bildiren detaylı bir çalışma protokolü sunulmuştur. Etik kurul onayı 13.03.2015 tarih ve 2015/146 sayılı kararı ile alınmıştır (Ek-2)

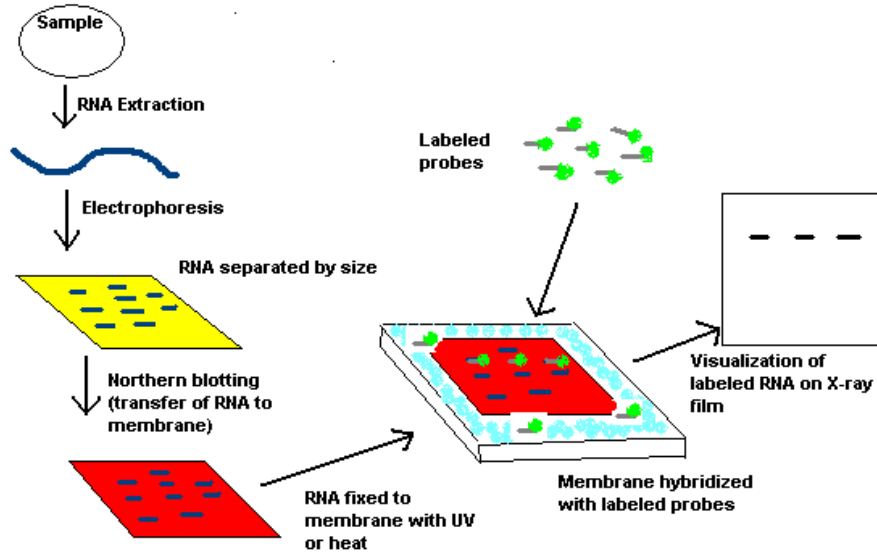
### **3.8. Gen Ekspresyonu Analiz Metodları**

Genomik DNA'dan transkripsiyona uğrayan genlerinin tamamına transkriptom veya gen ekspresyon profili adı verilir ve bu profil hücrenin fenotip ve fonksiyonunu belirler. Genom, organizmanın tüm hücrelerinde sabitken; gen ekspresyon profili, hücrenin içinde bulunduğu koşullara göre hızla değişebilen bir yapıdadır. Başta kanser gelişimi olmak üzere, çeşitli koşullarda genlerin ekspresyon düzeyleri değişmekte ve bu değişimler çeşitli yöntemler tarafından saptanmaktadır.

Bu yöntemlerden bazıları şu şekildedir:

#### **Northern Blot**

Hibridizasyon yöntemlerinden biridir. Analizi yapılacak materyal RNA'dır. Yüzey üzerinde RNA-DNA ya da DNA-DNA etkileşimi söz konusudur. Dokulardan elde edilen RNA jel elektroforeziyle ayrılır. Southern blotta ilk adım DNA'nın kesimi iken, RNA daha kısa bir molekül olduğu için elektroforez öncesi kesime ihtiyaç duyulmamaktadır. Elektroforez sonrası RNA EtBr ile boyanır. Sonrasında RNA nitroselülöz ya da naylon membrana aktarılır. Radyoaktif olarak işaretlenmiş tek iplikli DNA ya da antisens RNA ile hibridizasyon gerçekleştirilir. Hibridizasyon otoradyografi ile görüntülenir (Şekil 3.1.). Bant yoğunluğu mevcut mRNA'nın miktarıyla orantılıdır (Allison 2014).



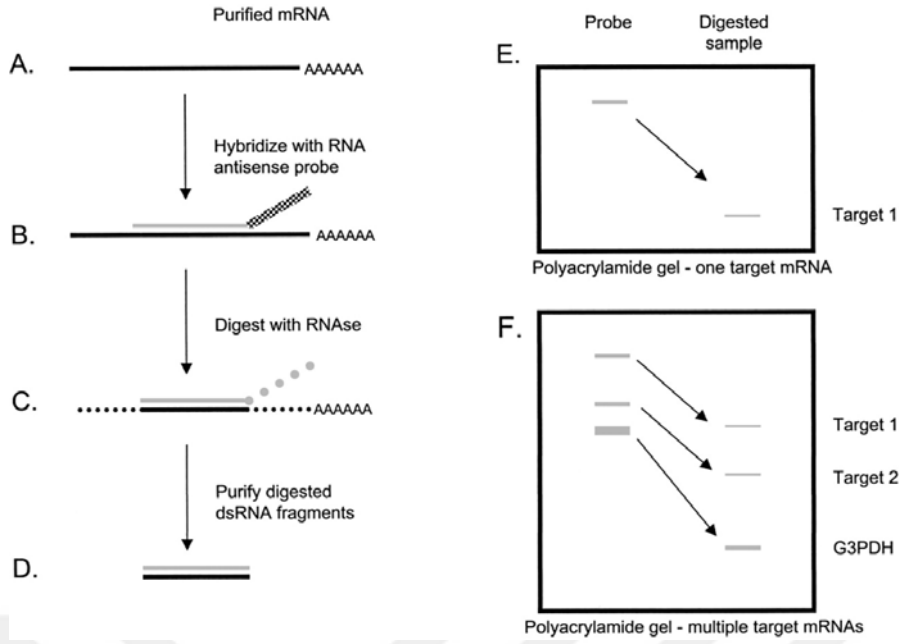
Şekil 3.1. Northern Blot tekniği (Web 5)

### İn situ Hibridizasyon(ISH)

Nükleik asitlerin ISH analizi ilk olarak 1969 yılında yapılmıştır. Hücre içerisinde RNA'nın lokalizasyonuna olanak sağlayan bir yöntemdir. Nükleik asitlerin hibridizasyonu esasına dayanır ancak işaretli problarla hibridize olmak için DNA ya da RNA yerine doku örneği kullanılır. Probların işaretlenmesinde EtBr yerine trityum kullanılır çünkü bu maddenin enerjisi fosfata göre düşüktür ve bu özelliğiyle daha kesin lokalizasyon sağlar. Hibridizasyon sonrası lam fotografik emülsiyona daldırılır ve gümüş tanecikleri mRNA'ın konumunu gösterir (Allison 2014).

### RNaz'dan Koruma Deneyi (RPA)

Spesifik bir mRNA transkriptini ve miktarını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. RPA'da temel mekanizma, ilgili RNA dizisine komplementer işaretli bir prob ile örneklerden elde ettiğimiz total RNA'nın hibridizasyonudur. Hibridizasyon sonrası ortamda işaretli proba eşleşen çift zincirli RNA örnekleri ve hibridizasyona uğramayan tek zincirli RNA örnekleri bulunmaktadır. Ortama çift zincirli RNA'yı kesmeyen ancak tek zincirli RNA'yı kesen ribonükleaz eklenir. Kesilmeyen RNA probun komplementeridir ve ilgili genden transkribe edilmiştir. Elde edilen numune jel elektroforezi ve otoradyografi ile analiz edilir (Allison 2014).



Şekil 3.2. RNaz'dan Koruma Deneyi teknik aşamaları (Rotmann 2002)

### Revers Transkripsiyon-PCR

Northern blot analizi ve RPA'ya kıyasla çok daha küçük miktarlardaki mRNA'nın analizinde kullanılabilir. İlk olarak total RNA ya da mRNA revers transkriptaz enzimi ile cDNA'ya dönüştürülür. cDNA gen spesifik primerler kullanılarak PCR'la çoğaltılır. PCR ürünleri jel elektroforeziyle analiz edilir. Tek hücrede belirli bir mRNA'nın olup olmadığını göstermede hassas olan bu yöntem, mRNA miktar ölçümü için uygun değildir (Allison 2014).

### Kantitatif Real-Time PCR (Q-PCR)

Floresan işaretli primerlerin ya da floresan boya kullanıldığı bir yöntemdir. PCR ürünleri gerçek zamanlı (anlık) ölçülebilir. Örneklerden elde edilen RNA revers transkripsiyon ile cDNA'ya dönüştürülür. cDNA, floresan özellikteki boyanın varlığında gene özgü primerler ile çoğaltılır. Boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığında parlak floresan ışın yayar. Ortamda çift zincirli DNA'lar arttıkça ışın miktarı da artar (Allison 2014).

### Mikroarray Yöntemi

Moleküler tekniklerin ve teknolojinin son yıllardaki gelişimi ile biyoteknolojinin ulaşabileceği son noktalardan biri olan mikroarray yöntemi ortaya çıkmıştır. Geleneksel moleküler metodlarda "bir deneyde bir gen" ilkesi geçerli iken tüm genomu görüntülemek

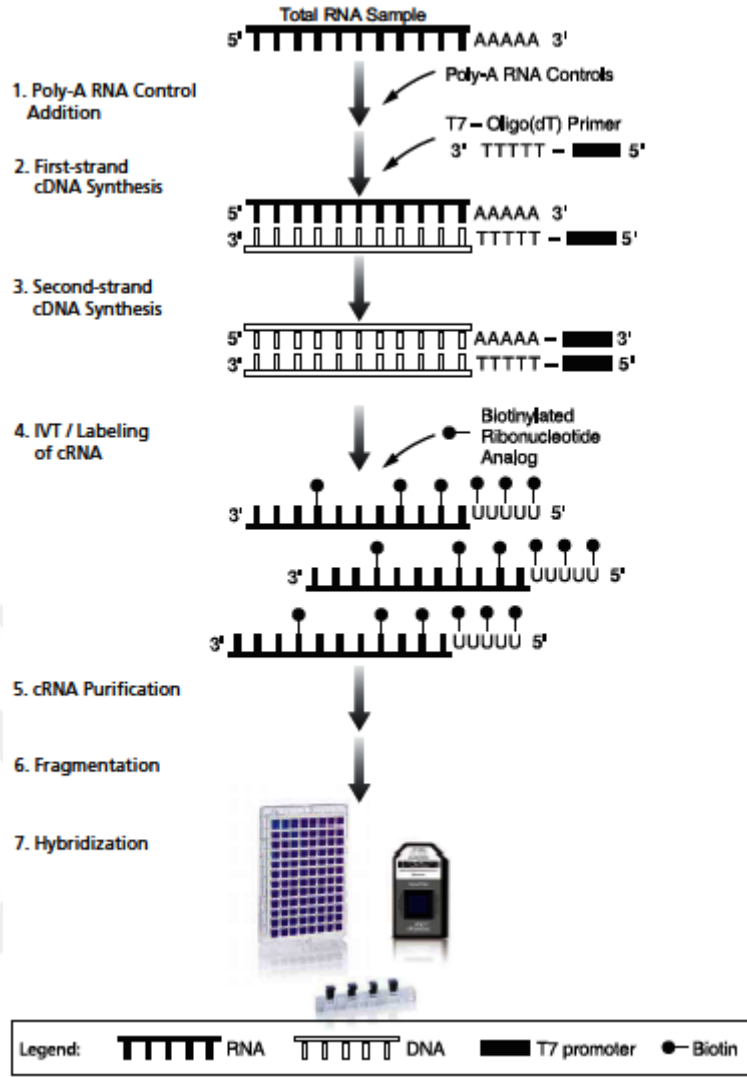
oldukça zordur ancak mikroarray yönteminin geliştirilmesi, basit bir çip üzerinde tüm genomun görüntülenmesine olanak sağlamıştır (Şimşek 2013). Yöntemde temel olarak, üzerinde belirli genlere karşılık gelen binlerce hedef dizinin bulunduğu çipler ve örneklerimize ait olan işaretlenmiş RNA'lar bulunmaktadır. Tümörlü doku ve sağlam dokudan elde edilen işaretlenmiş RNA örnekleri, çip üzerine dizilmiş hedef dizilerle hibridize olmak üzere yüzeye gönderilmektedir. Böylece hasta ve sağlıklı hücrelerdeki gen aktiviteleri kıyaslanarak, hastalıklara özgün gen ekspresyon değişimleri belirlenebilmektedir.

Yöntemin aşamaları şu şekildedir (şekil 3.3.) :

- Tümörlü doku ve normal dokudan RNA izolasyonu
- Elde edilen RNA'dan cDNA eldesi
  - cDNA ilk zincirinin sentezi
  - cDNA ikinci zincirinin sentezi
- cDNA'dan invitro ortamda RNA sentezi

Bu aşamada ortama biotin ile işaretlenmiş ribonükleotidler gönderilerek, biotin ile işaretlenmiş RNA elde edilir.

- Normal doku ve tümörlü dokudan elde edilen biotinle işaretlenmiş RNA örnekleri, yüzeyinde belirli genlere karşılık gelen binlerce hedef dizi bulunan çip üzerine gönderilir.



Şekil 3.3. Mikroarray yönteminin aşamaları  
(Gene Chip 3'IVT Express Labeling Assay)

Çalışmamızda kullandığımız yeni ve güçlü bir teknoloji olan mikroarray yönteminin çalışma basamakları şu şekildedir:

### 3.8.1 Total RNA izolasyonu

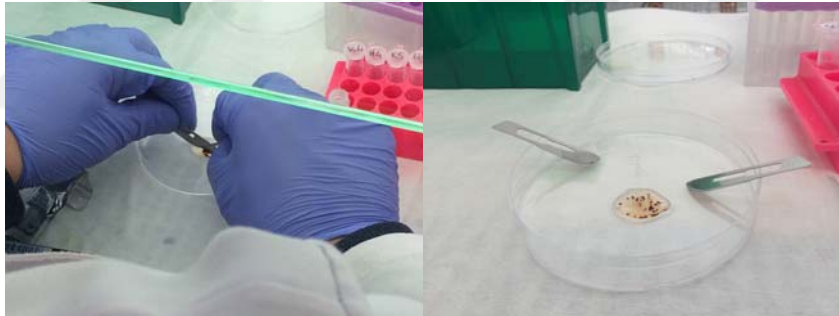
Histopatolojik olarak larenks kanser tanısı almış vakalardan ameliyat sırasında taze olarak alınan tümörlü doku ve normal doku örnekleri, RNA'nın korunması amacıyla hemen RNALater solüsyonu içerisine alındı. Dokular daha sonra RNA izolasyonu yapılmak üzere, -80 buzdolabında muhafaza edildi. İzolasyon aşamasında ilk önce mekanik etki ile homojenizasyona yardımcı olması amaçlı şekil 3.4.'de gösterilen içinde boncuk bulunan tüplerden, bead tube, 24 adet hazırlanarak üzerlerine hasta isimleri kaydedildi. Buffer RL (1 ml) içerisine protein yapısındaki bisülfid bağlarını çözerek proteinlerin

uzaklaştırılmasına yardımcı olması amacıyla beta merkaptanol (10 ul) eklendi ve vortekslendi. Hazırlanan karışımdan her bead tüpe 300 ul dağıtıldı.



Şekil 3.4. Norgen Bead Tube

Bu sırada RNA elde edilecek dokular -80 buzdolabından çıkarıldı ve ilk örnek petri kabının içerisine alınarak doku üzerine 300 ul buffer RL eklendi. Bistüri yardımıyla parçalanan doku içerisinde buffer RL ve beta merkaptanol bulunan bead tüplere aktarıldı (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Petri kabı içerisinde dokunun parçalanması

Tüpler homojenizatöre yerleştirilerek 4000 devirde 2 dk karıştırıldı ve bu işlem homojenizasyonun tam olarak sağlanabilmesi amaçlı 3 kez tekrarlandı (Şekil 3.6.). Homojenizasyon aralarında dokulardaki RNA degradasyonunu önlemek amaçlı, örnekler soğuk blokta bekletildi.



Şekil 3.6. Bead Bug Microtube Homojenizatör



Şekil 3.7. Micro 200R Hettich Zentrifugen Santrifuj

Homojenizasyon işlemi sonrası tüpler santrifuj edildi (Şekil 3.7.). Santrifuj sonrası tüplerin üzerindeki süpernatant kısım temiz tüplere aktarıldı ve böylece alt kısımda çöken partiküllerden -hücre artıkları, protein artıkları- dokumuz temizlendi. Sonrasında tüpler 600 ul RNase free su eklenerek vortekslendi (Şekil 3.8.). Örnek içerisinde kalan proteinlerin parçalanması amaçlı 40 ul proteinaz K eklendi ve tüpler tekrar vortekslendi. Bu işlem sonrasında numuneler 55 derecede 30 dakika ısı bloğunda bekletildi (Şekil 3.9.).



Şekil 3.8. Combi-Spin FVL-2400 N BIOSAN

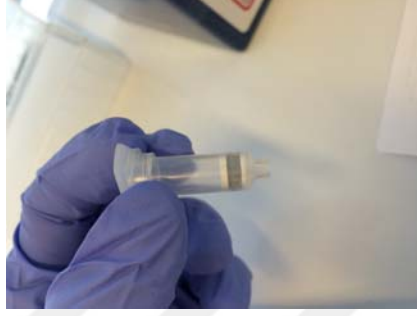


Şekil 3.9. CH-100 BioSan ısı bloğu

Isı bloğundan alınan örnekler 1 dakika maksimum hızda santrifuj edildi ve tüplerin üzerindeki kısım temiz tüplere aktarıldı. Sonrasında tüplere 450 ul %100 soğuk etanol eklenerek tüpler tekrar vortekslendi.

### **RNA'nın kolona aktarılması**

Vortekslenen tüplerdeki sıvıların 650'şer mikrolitresi RNA'nın kolonda tutunması amaçlanarak dizayn edilen kolon tüplerine aktarıldı (Şekil 3.10.) ve tüpler 6000 devirde 1 dakika santrifüj edildi. Elimizdeki materyalin 650 ul'den fazla olduğu örneklerden bu işlem tekrarlandı. Santrifüj sonrası tüm sıvının kolon altı seviyeye inmediği örnekler ise yüksek devirde, 14000, tekrar santrifüj edildi.



Şekil 3.10. Norgen spin column tüpleri

### **Yıkama Aşaması**

Kolon tüpleri ile santrifüj sonrası RNA'nın kolona tutunması sağlandı ve kolon seviyesi altında toplanan sıvı atılarak kolon temiz bir tüpe aktarıldı ve böylece yıkama aşamasına geçildi. İlk olarak örneklerin üzerine tuz içerikli wash solution A solüsyonu eklenerek maksimumda 2 dakika santrifüj edildi. Sonrasında kolon altındaki sıvı atılarak kolon temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine, ortamda kalan DNA'ların uzaklaştırılması amaçlı, 115 ul DNase I ve Enzyme Inkubation Buffer A karışımı eklendi. 14000 devirde 1 dakika santrifüj sonrası kolon altında toplanan miks tekrar kolon üzerine eklenerek tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlem ile DNase'in etkisinin maksimuma çıkarılması hedeflendi. DNA'ların uzaklaştırılmasını takiben kolon 2 kez daha 400 ul wash solüsyon A ile yıkandı ve son olarak da kolonun kuruması amaçlanarak üzerine solüsyon eklenmeden tüpler boş olarak santrifüj edildi.

Bu aşamaya kadar kolona tutunması sağlanan RNA'nın, kolondan temiz tüpe aktarılması amaçlanarak üzerine 25ul RNA Elution Solution A eklendi ve sonrasında 2000 devir/2 dakika ve 14000 devir 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada diğerlerinden farklı olarak kolon atılır ve alta kalan sıvımız RNA'mızdır. RNA degrades olmaması amaçlı hemen soğuk bloğa koyuldu ve elde edilen RNA miktarı Thermo Scientific Nonodrop

2000c ile ölçüldü. Kitimizde belirtilen ideal RNA miktarı 100-500 ng/ul'dir. Hastalarımıza ait örneklerde hedeflenen RNA değerlerine ulaşıldı. Elde edilen RNA'lar sonraki işlemlere kadar -80'de saklandı.



Şekil 3.11. Thermo Scientific Nanodrop 2000c

### **RNA Kalite ve Miktar Tayini**

Çeşitli biyolojik süreçlerle elde edilen RNA miktarı nanodrop cihazı ile ölçülerek değerlendirilmiştir. Ancak bu yöntemde RNA ile aynı absorbansa sahip moleküllerin de RNA olarak ölçülme ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle elde ettiğimiz RNA'yı saf olarak değerlendirmek için yeni bir yonteme ihtiyaç vardır. Elektroforez yöntemi ile RNA kalite ve miktar tayini esasına dayanan Agilent RNA 6000 Nano Kit sayesinde RNA miktarı saf olarak ölçülebildi. Yöntemin basamakları şu şekildedir:

1- Kit içerisinde hazır olarak bulunan 65 ul jel ve 1 ul RNA boyası (Şekil 3.12.) karıştırılarak 13000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.



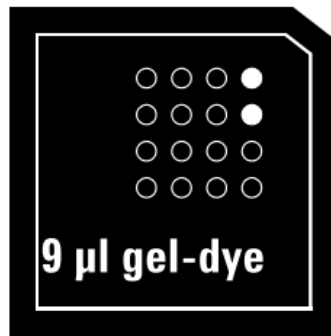
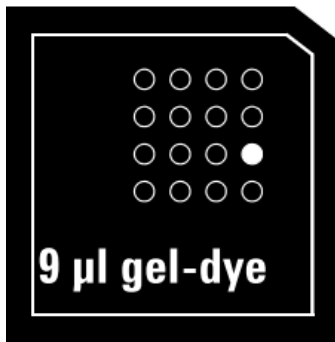
Şekil 3.12. Jel-RNA boyası karışımı

2- Bu esnada RNA çip yükleme istasyonuna yeni bir RNA çipi yerleştirildi (Şekil 3.13.). 12 örnek yüklenmesi amacıyla tasarlanan RNA çip üzerinde örneklerin ve ladderin yükleneceği kuyucuklar bulunmaktadır.



Şekil 3.13. RNA çipinin RNA çip istasyonuna yüklenmesi

3- **G** ile işaretlenen kuyucuğa hazırlanan jel-boya karışımından 9 ul eklendi ve çip yükleme istasyonu kapatıldı (Şekil 3.14.). İstasyon üzerindeki piston kısmı "1" çizgisine kadar ilerletildi ve 30 saniye beklendi. Pistonun yeniden yukarı çıkmasını takiben çip yükleme istasyonu açılarak G ile işaretlenen diğer 2 kuyucuğa da 9'ar ul jel-boya karışımı eklendi.



Şekil 3.14. Jel-boya karışımının eklenerek RNA çip istasyonunun kapatılması

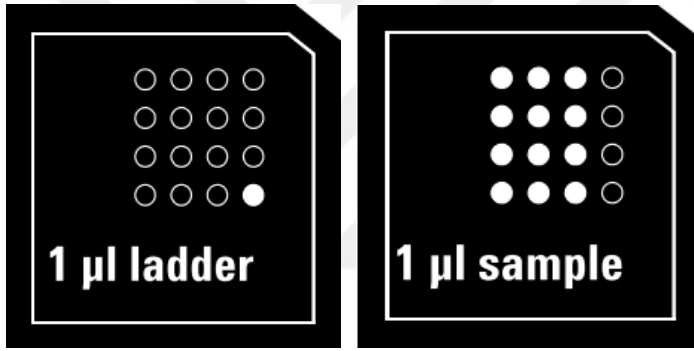
4- Jel-boya karışımı ilave ettiğimiz kuyucuklar dışında kalan 13 kuyucuğa (12 örnek kuyucuğu- 1 adet ladder kuyucuğu) 5'er ul RNA markerı ilave edildi (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Kuyucuklara RNA eklenmesi

5- Total RNA örneklerimizden 1'er ul tüplere alındı. RNA örnekleri ve ladder denatürasyon işlemi için 70 derecede 2 dakika bekletildi. İşlem sonrası örnekler ve ladder RNA'nın degradasyonunu önleme amaçlı soğuk bloğa alındı.

6- 1'er ul örnekler ve ladder kuyucuklara eklendi (Şekil 3.16.).



Şekil 3.16. Denatüre edilen ladder ve örneklerin kuyucuklara yüklenmesi

7- RNA çipi, çip için özel tasarlanmış vortekste 1200 rpm'de 2 dakika vortekslendi (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. RNA çipi için özel olarak tasarlanmış vorteks

8- Jelin kurumaması amaçlı RNA çipi 5 dakika içerisinde Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı içerisine yerleştirildi (Şekil 3.18.).

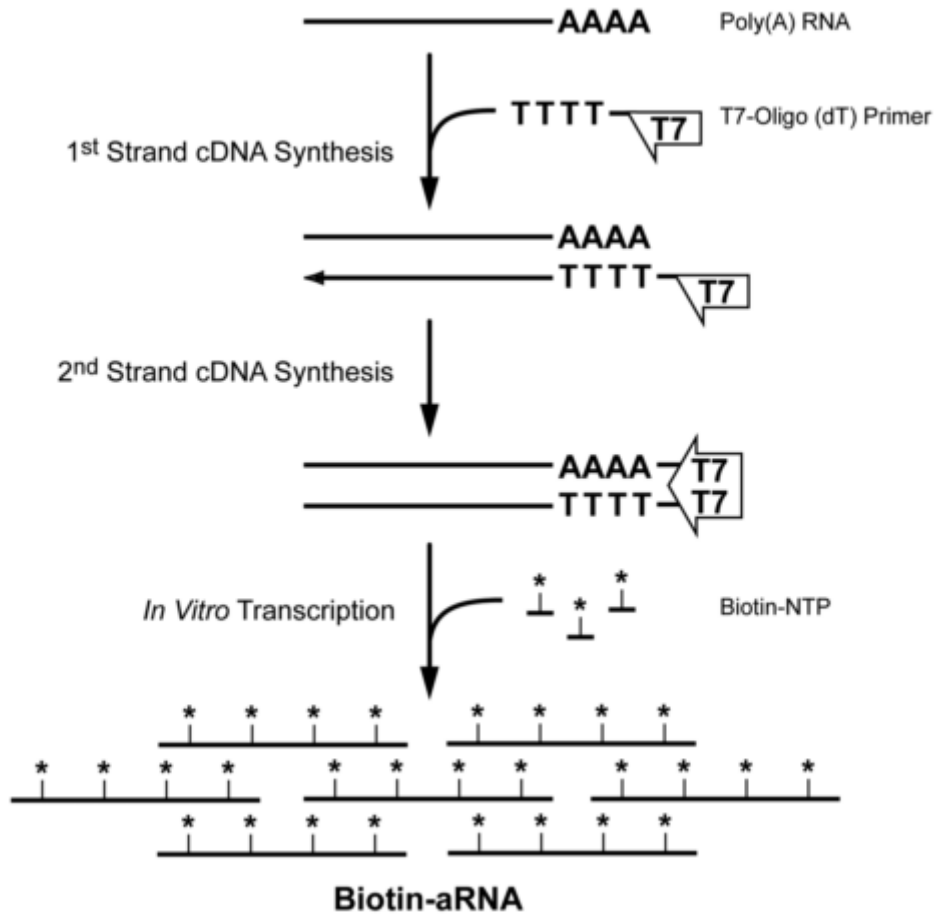


Şekil 3.18. Agilent 2100 Bioanalyzer

Örneklerimize ait RNA Bioanalizasyon Sonuçları bulgular bölümünde şekil 4.1. ve 4.2.'de gösterilmiştir. RNA biyoanalizasyon sonrası RNA kalitesini gösteren RNA Integrity Number (RIN) değeri elde edilmektedir. Bu değer 7 ve üzerinde olması çalışmamız için yeterlidir. Tüm örneklerimizin RIN değerleri istenilen aralıktadır.

### 3.8.2 RNA'dan cDNA sentezi

Elde edilen RNA mikroarray uygulaması için yüzey üzerine gönderilmeden önce cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA ise invitro şartlarda biotin işaretli RNA'ya dönüştürüldü (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19. ‘‘TargetAmp™-Nano Labeling Kit for Illumina® Expression BeadChip®’’ kit prosedür şeması

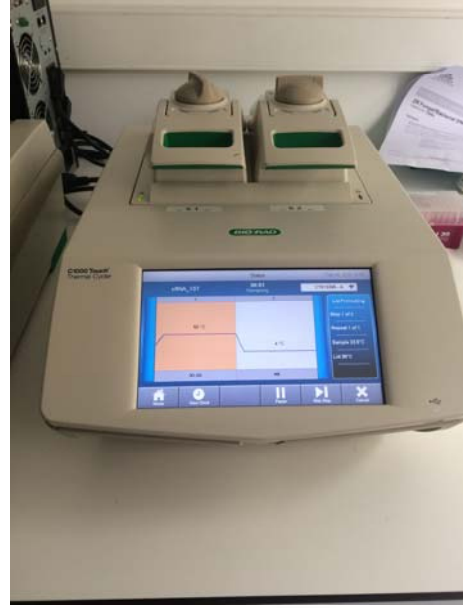
İşlem Basamakları ;

***cDNA'nın ilk zincirinin sentezi***

- 1- Örnek sayısı kadar tüp hazırlandı ve isimlendirildi.
- 2- Her tüpe 2 ul RNA ve 1 ul oligo (dT) primer eklendi.
- 3- Tüpler Hybex ısı bloğunda 65 derecede 5 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.20.).
- 4- Her örnek için 1.5 ul 1st-Strand cDNA PreMix, 0.25 ul DTT (dithiothreitol), 0.25 ul SuperScript III Reverse Transcriptase karıştırılarak miks hazırlandı.
- 5- İnkübasyon sonrası hemen soğuk bloğa alınan örneklerin üzerine hazırlanan miksten 2'şer ul eklendi.
- 6- Örnekler BIO-RAD C-1000 Touch PCR cihazında 50 derecede 30 dakika boyunca inkübe edildi (Şekil 3.21.).



Şekil 3.20. Hybex ısı bloğu



Şekil 3.21. BIO-RAD C-1000 Touch PCR cihazı

### ***cDNA'nın ikinci zincirinin sentezi***

- 1- Örnek başına 4.5 µl 2nd-Strand cDNA PreMix ve 0.5 µl 2nd-Strand DNA Polymerase eklenerek miks hazırlandı.
- 2-Örneklerin bulunduğu tüpler üzerine miksten 5'er µl eklendi.
- 3-Örnekler PCR cihazında 65 derecede 10 dakika, sonrasında 80 derecede 3 dakika inkübe edildi.

***Not:*** *İnkübasyon için PCR cihazının kullanım sebebi istediğimiz sıcaklık seviyesine kısa sürede ulaşabilmemizdir.*

- 4-İnkübasyonu takiben tüpler ortalama 16-20 saat (overnight) -20 derece buzdolabında bekletildi.

### **3.8.3 Biotin işaretli RNA'nın in-vitro transkripsiyonu**

- 1- -20 derece buzdolabında saklanan Transcription Buffer, UTP/Biotin-UTP, NTP PreMix, DTT çıkarılarak erimeye bırakıldı.

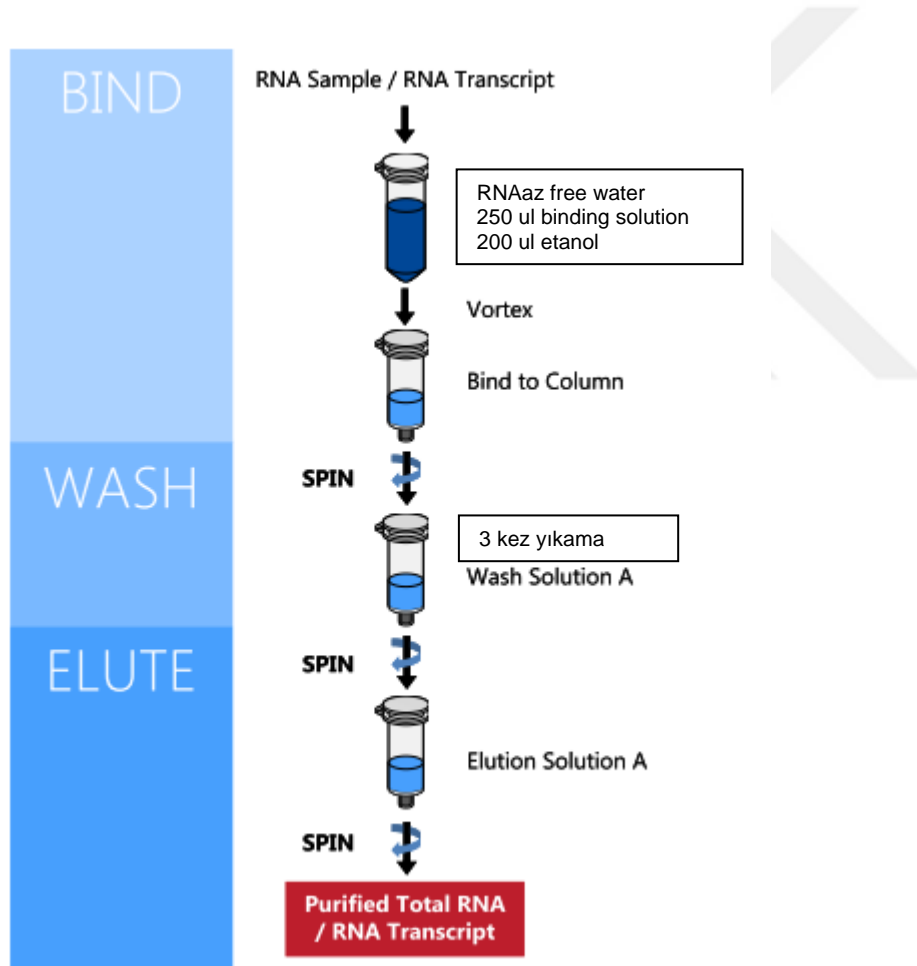
Örnek başına:

- 2 µl T7 Transcription Buffer
- 2 µl UTP/Biotin-UTP
- 10 µl NTP PreMix
- 3 µl DTT
- 2 µl T7 RNA Polymerase karıştırılarak miks hazırlandı.

- 2- RNA polimeraz enzimi -20' den çıkar çıkmaz erimesi beklenmeden karışıma eklendi.
- 3- Her tüpe hazırlanan miksten 20'şer ul koyuldu.
- 4- Örnekler PCR cihazında 42 derecede 4 saat inkübe edildi.
- 5- İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine 2'şer ul RNase free DNase eklenerek DNA artıkları ortamdan uzaklaştırıldı.
- 6- Numuneler tekrar PCR cihazında 37 derecede 15 dakika inkübe edildi.

### RNA Clean-up Aşaması

Tezimizin bu aşamasında Norgen RNA Clean-Up and Concentration Micro Kit 23600,43200 kiti kullanıldı. İşlem basamakları şekil 3.22.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.22. Norgen's RNA Clean-up ve Concentration Kit çalışma şeması

## **İşlem basamakları**

### ***RNA'nın kolona bağlanması***

- 1- İçerisinde 32 ul örnek bulunan tüplerimize örnek hacmini 100 ul'ye tamamlayacak şekilde 68 ul RNase free su eklendi.
- 2- Büyük tüplere aktarılan numuneler üzerine 250 ul binding solüsyon eklendi ve tüpler vortekslendi. RNA binding solüsyonu bir sonraki aşamada örneklerimizdeki RNA'ların kolon tüplerine tutunmasını sağlar.
- 3- Tüpler üzerine 200 ul %100 etanol eklenerek tekrar vortekslendi.
- 4- Numuneler kolonlara yüklendi ve maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 5- Santrifüj sonrası kolon altında kalan sıvı atılarak kolon yeni bir tüpe aktarıldı.

### ***Yıkama aşaması***

- 1- Tüplerin üzerine tuz içerikli yıkama solüsyonu olan 400 ul Wash Solution A eklendi.
- 2- Örnekler maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi.
- 3- Santrifüj sonrası kolon altında kalan sıvı atılarak kolon yeni bir tüpe aktarıldı.
- 4- Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
- 5- Son olarak kolon içeren tüpler maksimum hızda 2 dakika boş oklararak santrifüj edildi ve böylece RNA üzerindeki fazla su da uzaklaştırıldı.

### ***RNA Elüsyonu***

- 1- 25 ul RNA elution solüsyonu kolonlara eklendi.
- 2- Örnekler 2000 devirde 2 dakika, sonrasında 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- 3- RNA elution solüsyonu kolona tutunan RNA'yı kolondan ayırarak kolon alt kısmında toplanan sıvıya geçişi sağladığı için, diğer aşamalardan farklı olarak kolon atıldı ve altta kalan sıvı, cRNAmız, nanodrop ile ölçülmek üzere -20'ye kaldırıldı.

### ***cRNA'ların Eşitleme Aşaması***

Mikroarray yüzeyine gönderilecek numunelerin eşit konsantrasyonda olması amaçlanarak cRNA seviyeleri eşitlendi. Çalışmamız için gerekli ideal cRNA miktarı 150 ng/ul 'dir. İlk olarak RNA clean-up aşamasında elde edilen RNA miktarları nanodrop ile ölçülerek kaydedildi. Her bir örnek ul'sinde 150 ng cRNA olacak şekilde dilüe edildi ve cRNA miktarları eşitlendi.

### 3.8.4 Numunelerin Cihaza Yükleme Aşaması

Bu aşamada Illumina iScan cihazında, HumanHT-12 V4 Expression BeadChip kiti kullanılarak direk hibridizasyon yöntemi ile tüm genom ekspresyon uygulaması yapıldı. cRNA materyali kullanıldı.

*Gerekli Cihaz ve Ekipmanlar:* Illumina iScan cihazı, hibridizasyon fırını, Hybex ısı bloğu, santrifüj, rocker shaker

*Gerekli Materyal ve Kimyasallar:* HCB, HYB, Hyb Çemberi ve aksesuarları, 100% etanol, Block E1 Buffer, High Temperature Wash Buffer, Wash E1BC Buffer, Cy3 Streptavidin

*İşlem basamakları şu şekildedir;*

- Hibridizasyon,
- Yıkama,
- Streptavidin işaretlemesi,
- Kuruma,
- Görüntüleme

#### Hibridizasyon

1- Hibridizasyon fırını 58 °C'ye ayarlandı (Şekil 3.23.).



Şekil 3.23. Hibridizasyon Fırını

2- Hybex ısı bloğu 65 °C'ye ayarlandı.

3- HCB ve HYB fırında 10 dakika bekletildi ve içinde parçacık kalmadığına emin olundu.

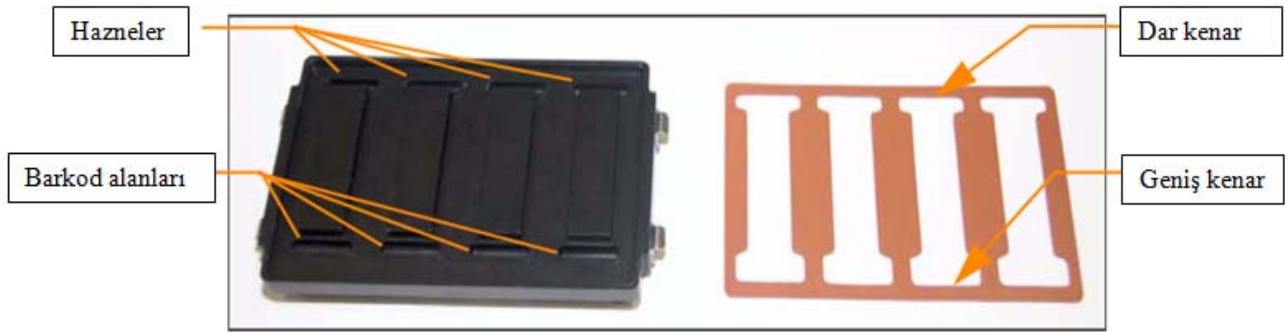
4- HCB ve HYB oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

HCB reaktifi: çipin nemli kalmasını sağlar.

HYB reaktifi: hibridizasyon için gereklidir.

### ***RNA'nın hazırlanması***

- 1-  $\mu\text{l}$ 'de 150 ng cRNA olacak şekilde, 10  $\mu\text{l}$  hibridizasyon tüpleri hazırlandı. Çalışma için gerekli total volüm 5 ul olmasına rağmen homojenizasyonun daha iyi sağlanabilmesi için 10 ul'lik tüpler hazırlandı.
- 2- cRNA örneklerinin olduğu tüp  $65^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika bekletildi.
- 3- cRNA tüpleri vortekslendi ve 250 xg'de pulse santrifüj yapıldı.
- 4- cRNA tüpleri oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
- 5- cRNA tüplerine 20  $\mu\text{l}$  HYB eklendi. Toplam hacim 30  $\mu\text{l}$  olacak şekilde hazırlandı.
- 6- Hyb çemberi içerisine 1 adet gasket yerleştirildi (Şekil 3.24).
- 7- Hyb çember haznesine 200  $\mu\text{l}$  HCB eklendi (Şekil 3.25.).
- 8- Çember kapağı kapatıldı ve Beadchip hazırlanana kadar oda sıcaklığında bekletildi.



Hibridizasyon çemberi ve gasket



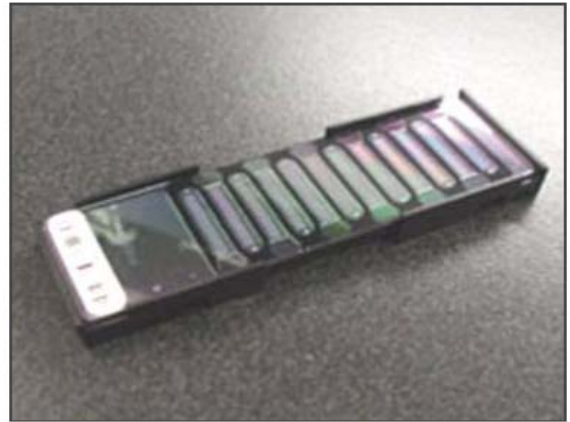
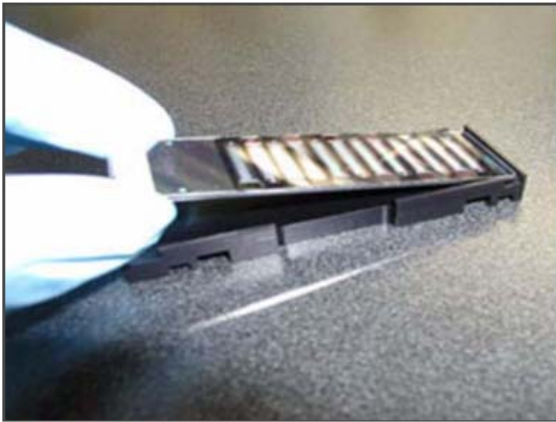
Şekil 3.24. Gasketin Hibridizasyon Çemberine Yerleştirilmesi



Şekil 3.25. Hibridizasyon Çember Haznesine HCB eklenmesi

### ***Örneklerin Yüklenmesi***

1. Beadchipler paketlerinden çıkartıldı.
2. Hyb insert üzerine barkod yeri barkoda gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 3.26.).



Şekil 3.26. Çipin Yerleştirilmesi

3. Hazırlanan örneklerden 15 µl alınarak çipe yüklendi. Yükleme sırası kaydedildi. Örnek, yüklenecek yerin (inlet port) tam ortasına bırakıldı. Örneğin çipin tüm yüzeyine dağıldığından emin olundu. İnlet port'ta bir kısım örnek geç dağılıbilir, bu normaldir.
4. Hyb chamber kapağı açıldı ve insert üzerinde örnek yüklenmiş Beadchipler konuldu (Şekil 3.27.).



Şekil 3.27. Çipin Hibridizasyon Çemberine Yerleştirilmesi

5. Hyb chamber barkod kısmı ve insert üzerindeki barkod kısmının üst üste geldiğinden emin olundu.

#### ***BeadChip Hibridizasyonu***

1. Hyb chamber kapatıldı ve kilitlendi. Çapraz kilitler aynı anda kilitlendi. Tamamen kapalı olduğundan emin olundu.
2. Hyb chamber daha önce ayarlanmış olan 58 °C'de hibridizasyon fırınına konuldu.
3. Hibridizasyon süresi en az 14 saat olmakla beraber 20 saati geçmemelidir.

#### ***High Temp Wash Buffer Hazırlanması***

1. Bir sonraki gün yıkamada kullanmak üzere, 50 ml 10X High-Temp Wash buffer üzerine 450 ml RNase-free su eklenerek 1X High-Temp Wash buffer elde edildi.
2. Hybex ısı bloğu içerisine Hybex su banyosu başlığı takıldı ve hazırlanan 500 ml 1X High-Temp Wash buffer eklendi (Şekil 3.28.).

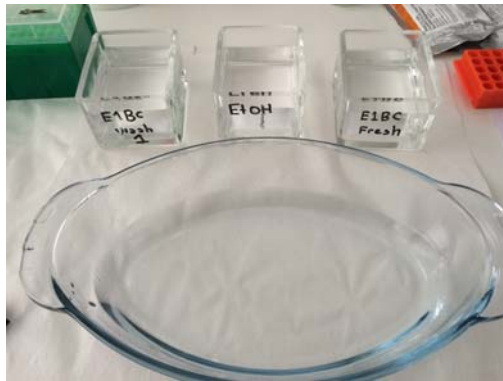


Şekil 3.28. Hybex su banyosuna High Temp Wash Buffer eklenmesi

3. Hybex ısı bloğu 55 °C'ye ayarlandı. High-Temp Wash buffer gece boyunca orada bırakıldı.

### **Yıkama**

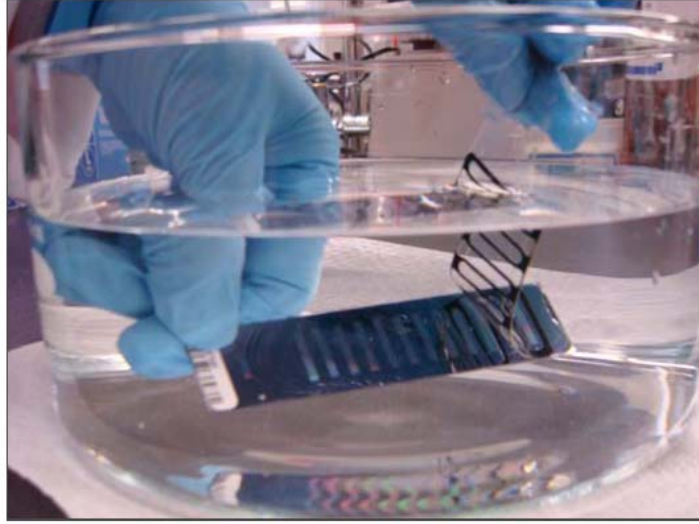
- 3 ml E1BC buffer, 1 L RNase-free suyun içerisinde konularak Wash E1BC solüsyonu hazırlandı.
- 250 ml Wash E1BC solüsyonu cam yıkama kabına konuldu. (2 adet)
- 500 ml Wash E1BC solüsyonu Pyrex isimli geniş borcamca konuldu (Şekil 3.29.).
- 250 ml 100% Etanol ayrı bir cam yıkama kabına konuldu.



Şekil 3.29. Wash E1BC ve Etanol solüsyonları

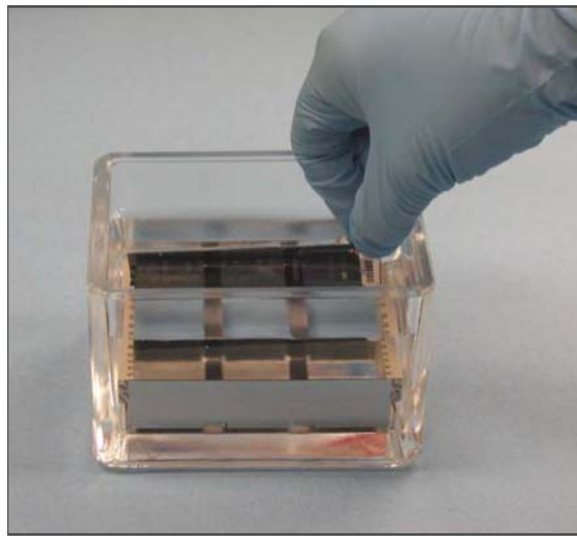
### ***Koruyucu Yüzey Çıkarılması***

1. Hyb Chamber fırından çıkarıldı ve benç üzerine kondu.
2. BeadChip çıkarılarak Borcam içerisindeki Wash E1BC solüsyonu içerisinde bırakıldı. Pudrasız bir eldiven giyilerek, tamamı solüsyon içerisinde olduğundan emin olarak üzerindeki koruyucu çıkarıldı (Şekil 3.30.).



Şekil 3.30. Çip üzerindeki koruyucu yüzeyin çıkarılması

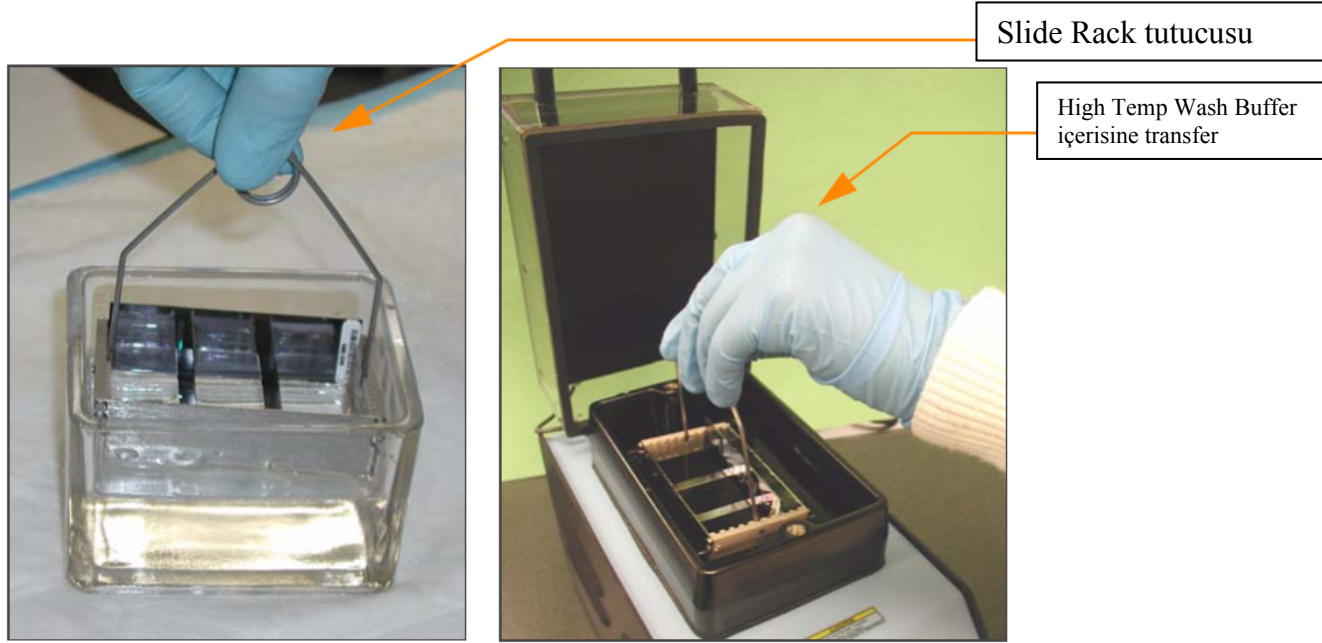
3. BeadChipler, cımbız veya eldiven ile tutularak borcam içerisinde slide rack üzerine yerleştirildi (Şekil 3.31.).



Şekil 3.31. Bead Chiplerin slide racklara yerleştirilmesi

### ***High-Temp Yıkaması***

1. Slide rack tutucusu yardımıyla slide rack bir gün önce hazırlanmış olan High-Temp Wash buffer içerisinde transfer edildi (Şekil 3.32.).

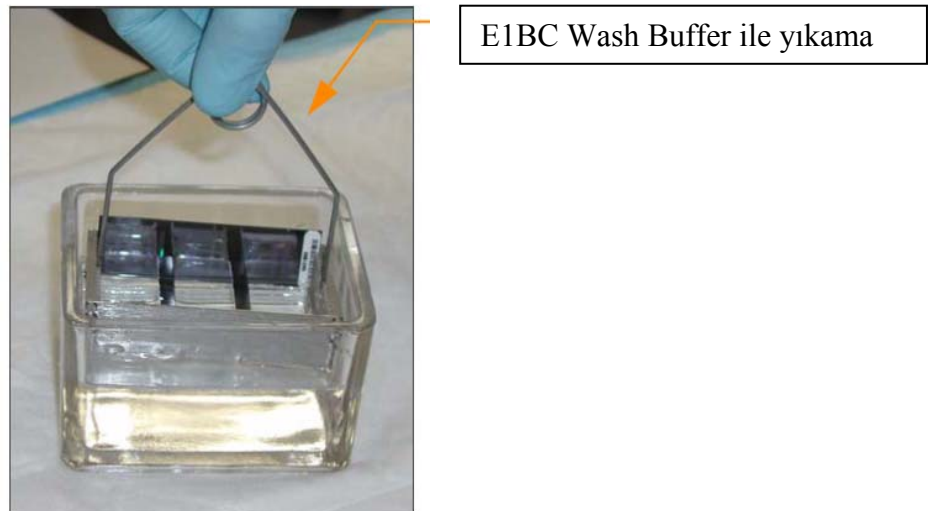


Şekil 3.32. Slide racklara yerleştirilen çiplerin High Temp Wash Buffera transferi

2. Hybex ısı bloğunun kapağı kapatıldı ve 10 dakika inkübe edildi.

### ***Birinci Yıkama (First Room-Temp Wash)***

1. İnkübasyonun ardından slide rack derhal birinci Wash E1BC solüsyonu içerisinde konuldu (Şekil 3.33.).



Şekil 3.33. Slide rackın Wash Buffer ile yıkanması

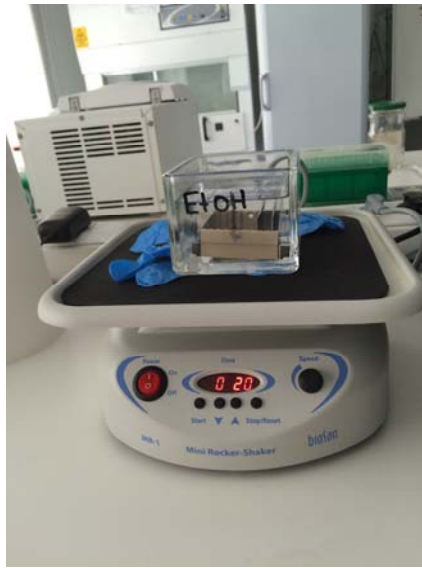
2. Yaklaşık 10 defa slide rack tutucusu yardımıyla batır-çıkart hareketi yapıldı.
3. Orbital shaker orta hıza ayarlandı.
4. Cam yıkama kabı oda sıcaklığında 5 dakika orbital shaker üzerinde bırakıldı (Şekil 3.34). Sallanma hızı solüsyonun dökülmeyeceği en yüksek hıza ayarlandı.



Şekil 3.34. Slide rackların Wash Buffer solüsyonu ile karıştırılması

#### ***Etanol Yıkaması***

1. Rack 250 ml Etanol içeren kaba aktarıldı.
2. Yaklaşık 10 defa slide rack tutucusu yardımıyla batır-çıkart hareketi yapıldı.
3. Cam yıkama kabı oda sıcaklığında 10 dakika orbital shaker üzerinde bırakıldı (Şekil 3.35.).



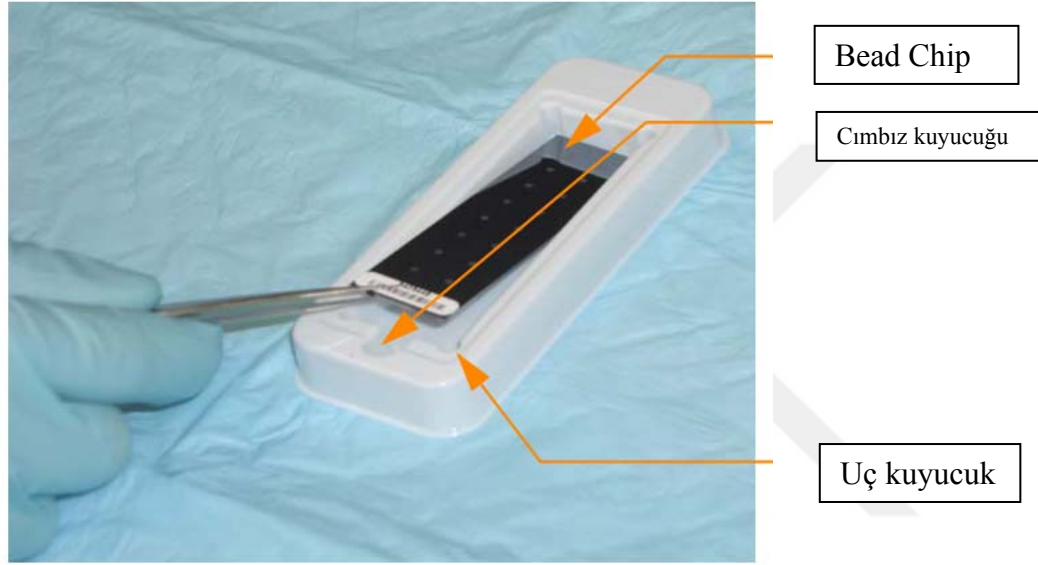
Şekil 3.35. Slide rackın etanol ile karıştırılması

### ***İkinci Yıkama (Second Room-Temp Wash)***

1. Rack en son kullanılan Wash E1BC solüsyonu içerisine alındı.
2. Yaklaşık 10 defa slide rack tutucusu yardımıyla batır-çıkar hareketi yapıldı.
3. Cam yıkama kabı oda sıcaklığında 2 dakika orbital shaker üzerinde bırakıldı.

### ***Bloklama***

1. BeadChip yıkama kabının her birine 4 ml Block E1 buffer eklendi.
2. Cımbız yardımıyla BeadChip tabla (tray) içerisine yerleştirildi (Şekil 3.36.). Barkod tablanın uç kısmındaki kuyunun olduğu yere denk gelmelidir.



Şekil 3.36. BeadChip'in yıkama kabına yerleştirilmesi

3. BeadChip yüzeyinin tamamen buffer ile kapladığından emin olunmalıdır.
4. Yıkama kabı içerisindeki BeadChip orta hızdaki rocker üzerinde 10 dakika bırakıldı (Şekil 3.37.).



Şekil 3.37. Yıkama kabı içindeki BeadChip'in çalkalanması

5. Cy3-Streptavidin dolaptan çıkarılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Bu arada Hyb Chamber distile sudan geçirilerek temizlendi.

### Streptavidin İşaretlemesi

İlk olarak iScan cihazı açılarak lazerin ısınması ve optimize olması sağlandı.

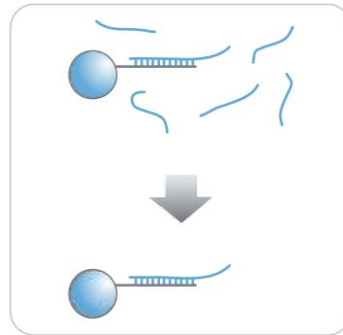
1. Falcon içerisine, her bir çip için, 2 ml Block E1 Buffer üzerine 2µl Cy3-Streptavidin eklendi.
2. Yeni bir tabla alındı ve hazırlanan karışım tabla üzerine eklendi. BeadChip cımbız yardımıyla barkoddan tutularak tablaya kondu ve yüzeyinin tamamen kaplandığından emin olundu.
3. Tablanın kapağı kapatılarak orta hıza ayarlı rocker shaker üzerinde 10 dakika bekletildi (Şekil 3.38.).



Şekil 3.38. Çiplerin streptavidin ile işaretlenmesi

### Üçüncü yıkama (Third Room-Temp Wash)

1. BeadChip tabladan cımbız yardımıyla alındı ve slide rack üzerine yerleştirilerek fresh Wash E1BC'ye daldırılarak 5 kez batır-çıkartıldı.
  2. Orbital shaker orta hıza ayarlandı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Bead Chip yıkama aşaması ile proba tutunamayan RNA'lar uzaklaştırıldı ve kurutma aşamasına geçildi (Şekil 3.39.).



Şekil 3.39. Bead Chip yıkama aşaması ile proba tutunamayan RNA'ların uzaklaştırılma şeması

## Kurutma

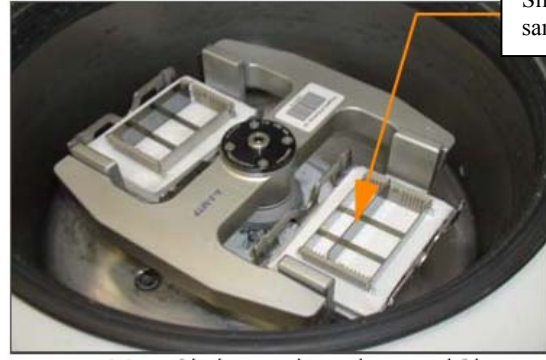
BeadChip yıkama solüsyonundan çıkarıldıktan sonra yüzey buğulanmasını önlemek için hemen santrifüj edilmelidir.

1. Santrifüj ayarlandı. (1400 rpm, oda sıcaklığı, 4 dakika )
2. Fazla solüsyonun emilmesi için slide rack altına havlu peçete konuldu (Şekil 3.40.).



Şekil 3.40. Slide rack kurutulması

3. Pudrasız eldiven yardımıyla BeadChip slide rack hızlıca Wash E1BC'den çıkarıldı ve santrifüje konuldu. Kapak kapatılarak Start'a basıldı. 1400 rpm'de 4 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi (Şekil 3.41.).



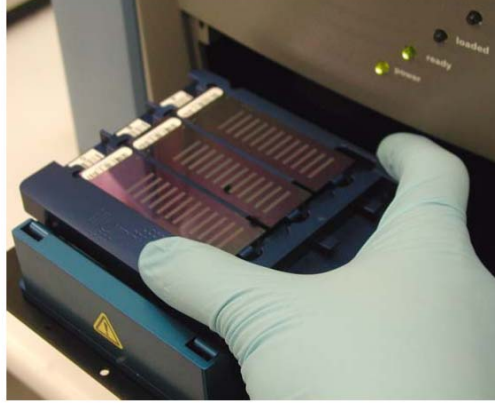
Slide rack'ın  
santrifüje yerleşimi

Şekil 3.41. Slide rack santrifüj aşaması

Görüntüleme aşamasına hemen geçilmeyecekse BeadChip kuru, karanlık ve ozonsuz bir ortamda saklanmalıdır.

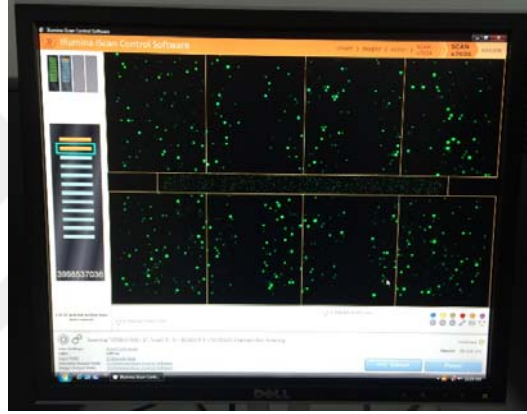
## Görüntüleme

1. iScan Control Software uygulaması başlatıldı.
2. BeadChip okuma tepsi otomatik olarak açıldı, BeadChipler tepsi üzerindeki taşıyıcıya, barkod kısmı barkoda gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 3.42).



Şekil 3.42. BeadChip'in cihaza yerleştirilmesi

3. Tarama başlatıldı. Tarama yapılırken ilk aşama olarak kalibrasyon yapıldı. Sonra BeadChip okuması gerçekleştirildi (Şekil 3.43.).



Şekil 3.43. BeadChip okuma aşaması

4. Tarama bittiği zaman BeadChip çıkarılarak kuru ve karanlık bir ortamda muhafaza edildi. Veriler biyoinformatik analiz için hazır hale getirildi.

### 3.9. İstatistiksel Analizler

Çalışmalara 47.323 adet proba başlanarak problemler ekspresyon seviyelerine göre filtrelenmiştir. Normalize datalardan %20'nin altında ışığa aldığımız problemler filtrelenmiştir ancak filtreye takılan prob olmamıştır. Bir probtan, herhangi bir grupta %20'nin üzerinde ışığa alındıysa, filtreden geçmesi sağlanmış ve bu sayede prob kaybı en aza indirilmiştir. FC (Fold Change) analizi yapılarak 2'den büyük kat değişimleri her bir prob için artış ve azalış olarak belirlenmiştir. Artan ve azalan problemler için heat-map (sıcaklık haritası) gösterimi raporlanmıştır. Up regüle problemlerin sıcaklık haritasında değerleri yeşil, down regüle problemlerin ise kırmızı olarak gösterilmiştir. Siyah renkli bölgeler, belirtilen gende anlamlı değişiklik olmadığını göstermektedir.

## 4. BULGULAR

### Yaş

Olgularımız 37-86 yaşlar arasında olup, yaş ortalamaları 60,8'dir(ortanca değer: 61, standart sapma (SS): 14.11). Kanser tanısı almış vakalardan patolojik dokunun yanı sıra normal larenks dokusu da alındığından kontrol grubumuzu da aynı vakalar oluşturmaktadır.

### Cinsiyet

Çalışmaya dahil edilen tüm bireyler erkek cinsiyettedir. Larenks kanserleri, insidans bakımından tüm kanserler arasında erkek/kadın oranı en yüksek olan kanserdir.

### Tümör Lokalizasyonu

Tümör, olguların 3'ünde (%25) supraglottik, 5'inde (%41) glottik, 4'ünde transglottik (%33) yerleşimlidir. Transglottik yerleşimli olgularda tümör, subglottik ve supraglottik alana yayılmış durumdadır. Örneklerimiz arasında subglottik bölge kaynaklı kansere rastlanmamıştır.

### Örnek Kodlaması

Çalışma kapsamında; 12 farklı gruptan toplam 24 adet RNA örneği elde edilmiştir. Bu örneklerin cRNA dönüşümleri yapılarak Illumina iScan platformunda 47.323 prob kullanılarak, "HumanHT-12 V4 Expression BeadChip" ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır. Çalışmada toplam 12 farklı grup vardır ve örnek kodları aşağıdaki gibidir.

Tablo 4.1. Örnekler ve gruplama

Örnek Kodu	Örnek Kodu
K1	H1
K3	H3
K4	H4
K5	H5
K6	H6
K7	H7

Örnek Kodu	Örnek Kodu
K8	H8
K9	H9
K10	H10
K11	H11
K12	H12
K13	H13

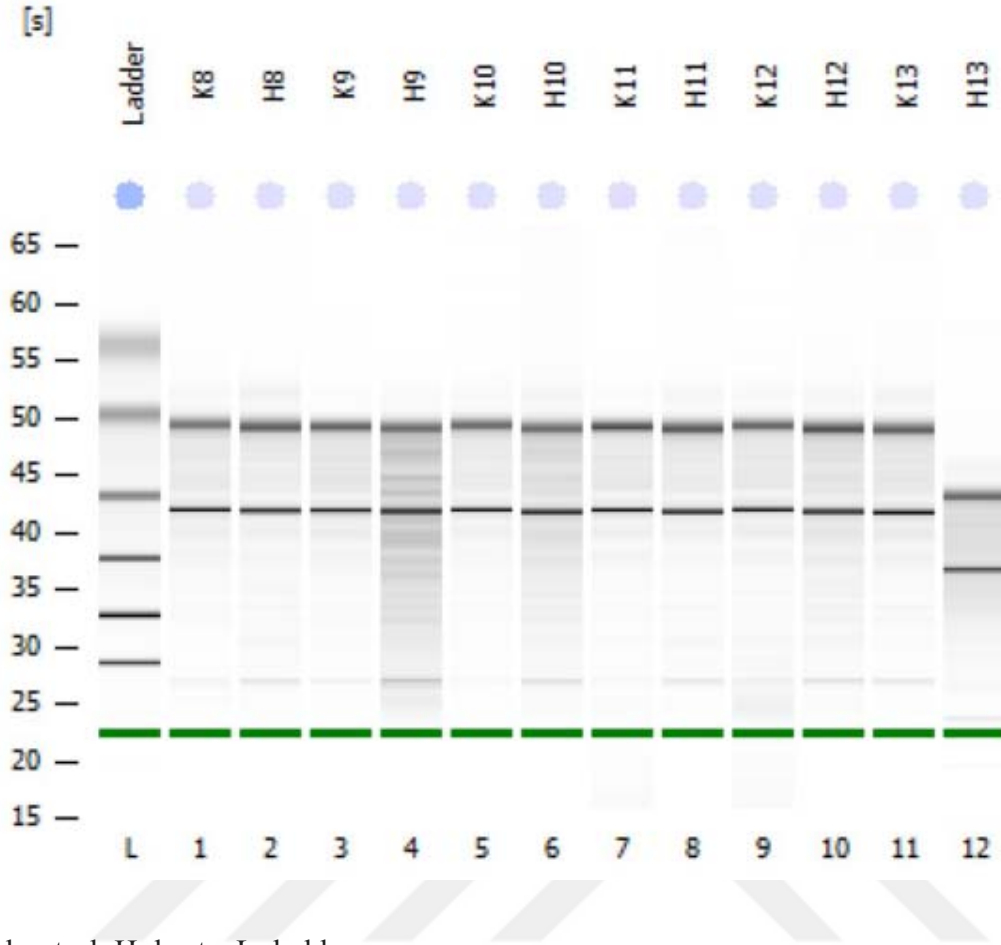
H: hasta, K: kontrol

Tablo 4.2. Karşılaştırma Grupları

	HEDEF GRUP	KONTROL GRUP
1.Karşılaştırma	H1	K1
2.Karşılaştırma	H3	K3
3.Karşılaştırma	H4	K4
4.Karşılaştırma	H5	K5
5.Karşılaştırma	H6	K6
6.Karşılaştırma	H7	K7
7.Karşılaştırma	H8	K8
8.Karşılaştırma	H9	K9
9.Karşılaştırma	H10	K10
10.Karşılaştırma	H11	K11
11.Karşılaştırma	H12	K12
12.Karşılaştırma	H13	K13

**RNA kalite ve miktar tayini aşaması sonrası elde edilen örneklerimize ait RNA biyoanalizasyon sonuçları:**

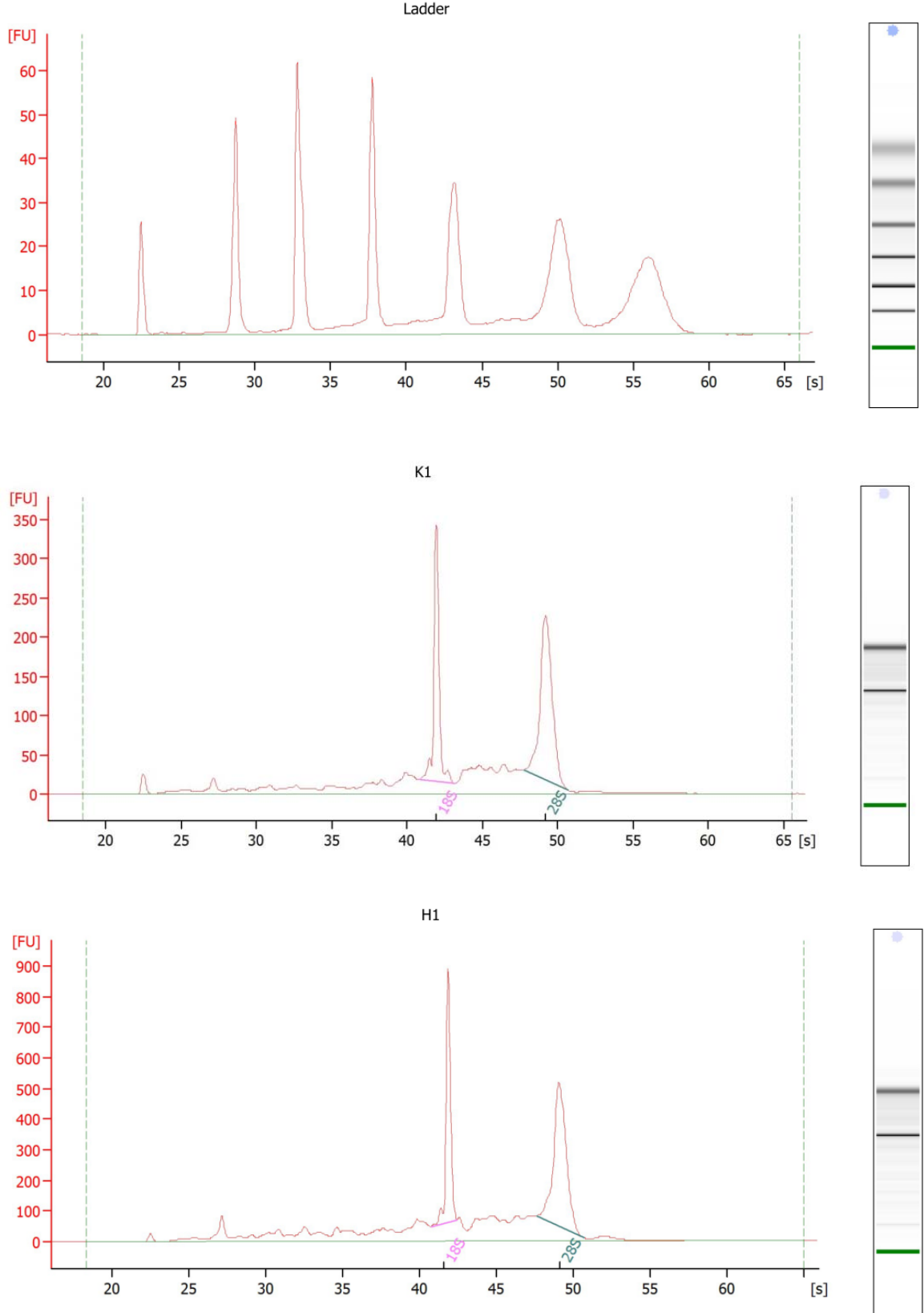
Çalışmamızın ilk aşamasında vakalarımıza ait örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilerek, mikroarray prosedürü için gerekli olan total RNA miktarlarına ulaşılmıştır. Elde edilen RNA'nın kalitesini tayin etmek amacıyla ise RNA biyoanalizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, RNA kalite belirteçlerinden biri olan RIN(RNA Integrity Number) değeri her örnek için hesaplanmış ve RIN değerinin 7 ve üzerinde olması yeterli kabul edilmiştir. Tüm örneklerimize ait RIN değerleri hedeflenen aralıktadır. Örneklerimize ait RNA biyoanalizasyon sonuçlarının jel elektroforez ve elektroforegram görüntülerine örnekler şekil 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir.



K: kontrol, H: hasta, L: ladder

Şekil 4.1. RNA biyoanalizasyon sonuçları, 6 hastamıza ait jel görüntüsü

İlk sütunda yer alan ladder "L" çalışmamızın kontrolü olup, 7 adet band/pik vermesi çalışmanın doğru yapıldığını göstermektedir. Örneklerimizin ise 18S ve 28S de 2 adet band/pik vermesi RNA'ların yeterli kalitede olduğunu göstermektedir. Leader ve 1 numaralı vakamıza ait RNA biyoanalizasyon sonuçlarının elektroforegram görüntüleri şu şekildedir:

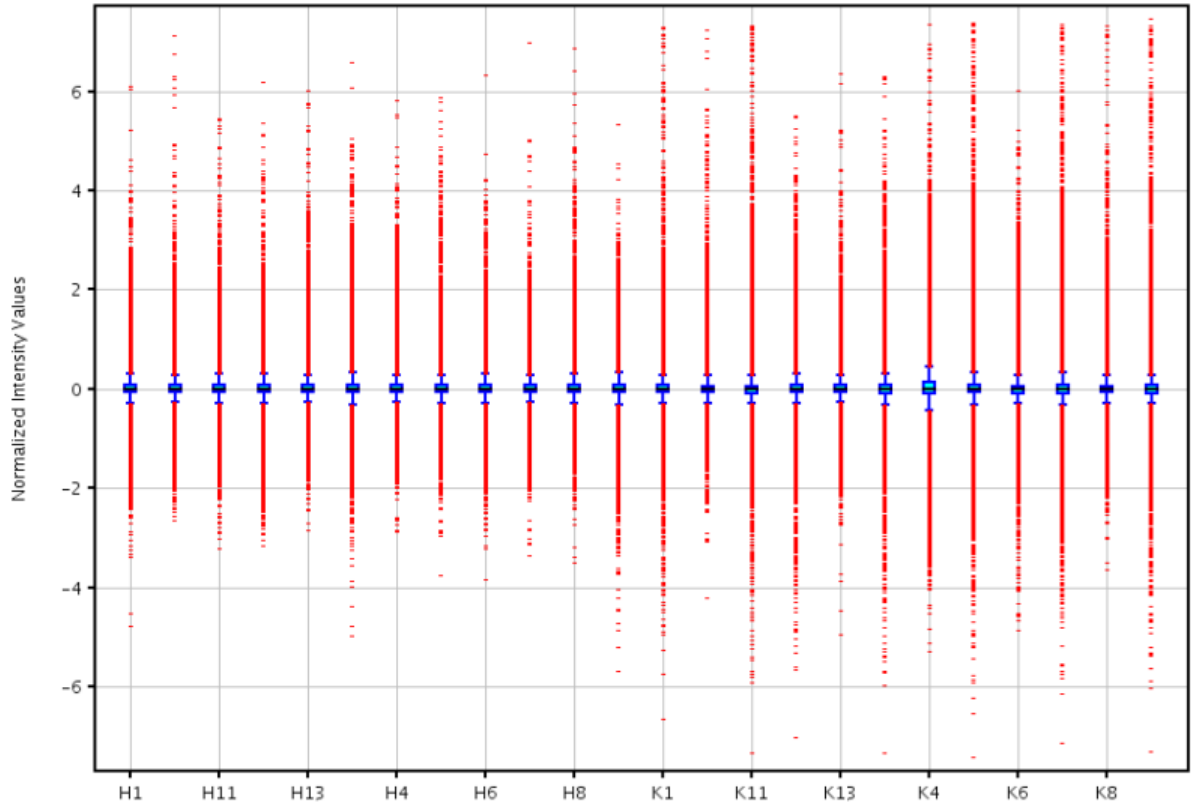


Şekil 4.2. 1 nolu örneğimize ait RNA biyoanalizasyon sonuçları, elektroforegram görüntüsü

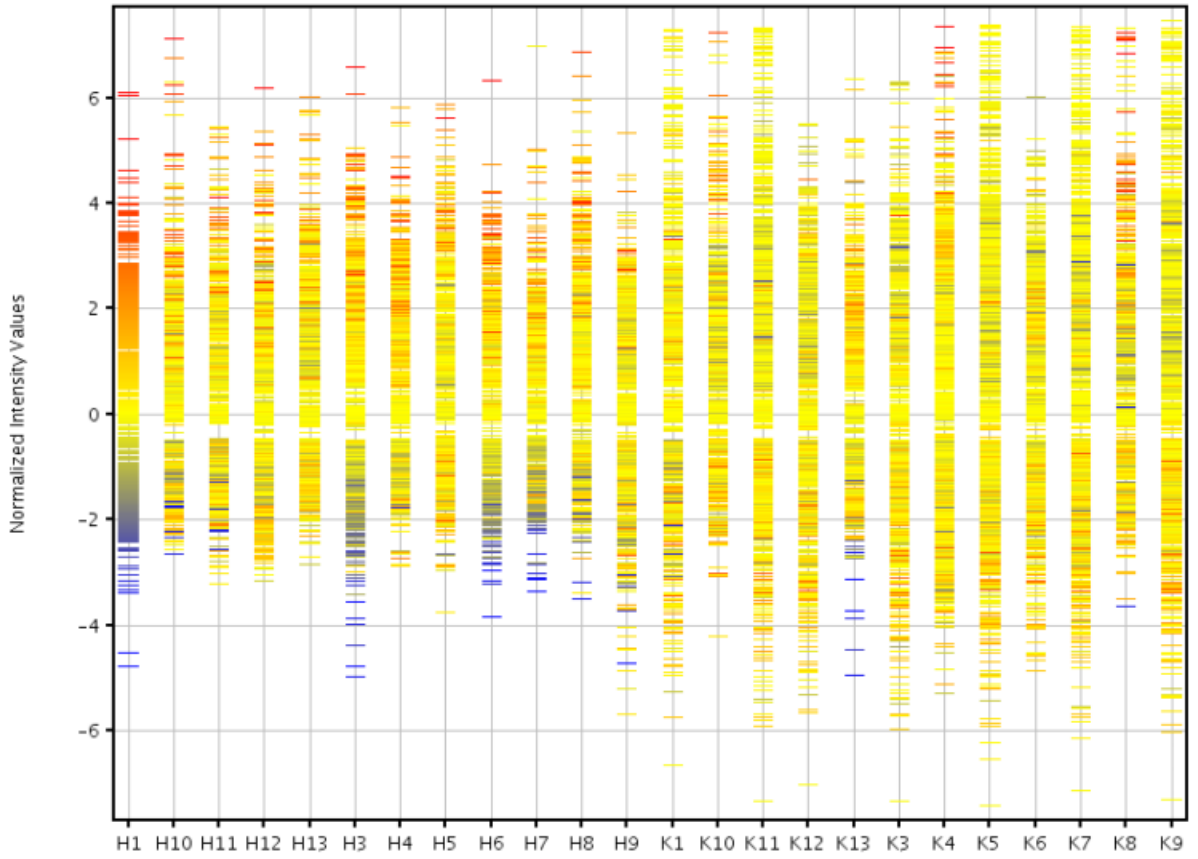
Diğer örneklerimize ait grafler de benzer şekildedir.

### Verilerin kalite kontrolü

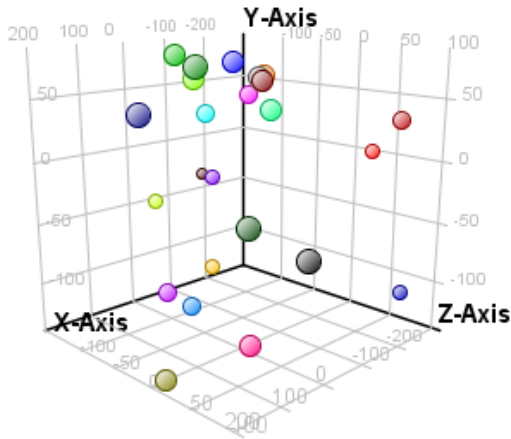
Çalışma tamamlandıktan sonra elde ettiğimiz ham mikrodizi verisi GenomeStudio programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Mikroarray verilerinin kalite kontrol amaçlı oluşturulan sinyal yoğunluk grafikleri şekil 4.3., 4.4. ve 4.5.'de gösterilmiştir. Tüm örneklerin verisi yüzdelik (quantile) normalizasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 4.3. Profile Plot gösterimi



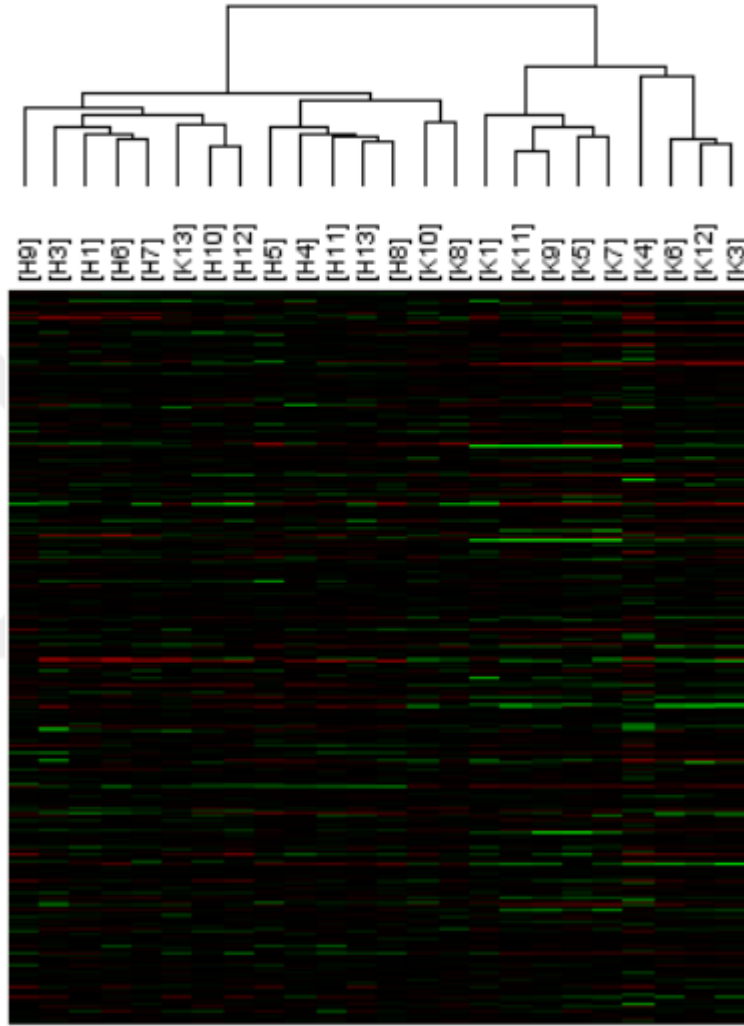
Şekil 4.4. Box Plot Gösterimi



Şekil 4.5. PCA Plot Gösterimi: örneklerin gen ekspresyon profili bakımından birbirine olan yakınlığını gösterir.

## Cluster (Kümeleme) Analizleri

Normalize edilen verilerin tüm genom gen ekspresyon profilleri arasında yapılan hiyerarşik kümeleme ‘Hierarchical’ yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Uzaklık birimi olarak ‘Euclidean’ ve bağlantı kuralı ‘Wards’ olarak seçilmiştir.



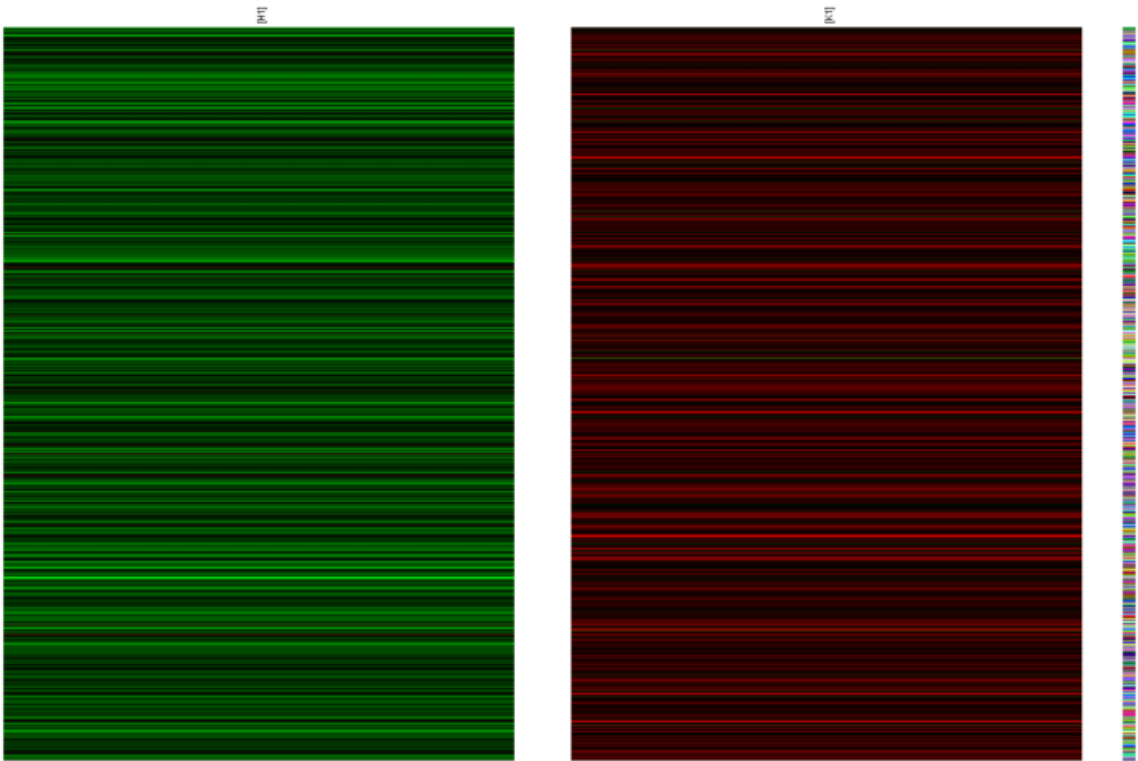
Şekil 4.6. Gruplar baz alınarak yapılan Cluster Analizi

## Karşılaştırılmalı Grup Sonuçları

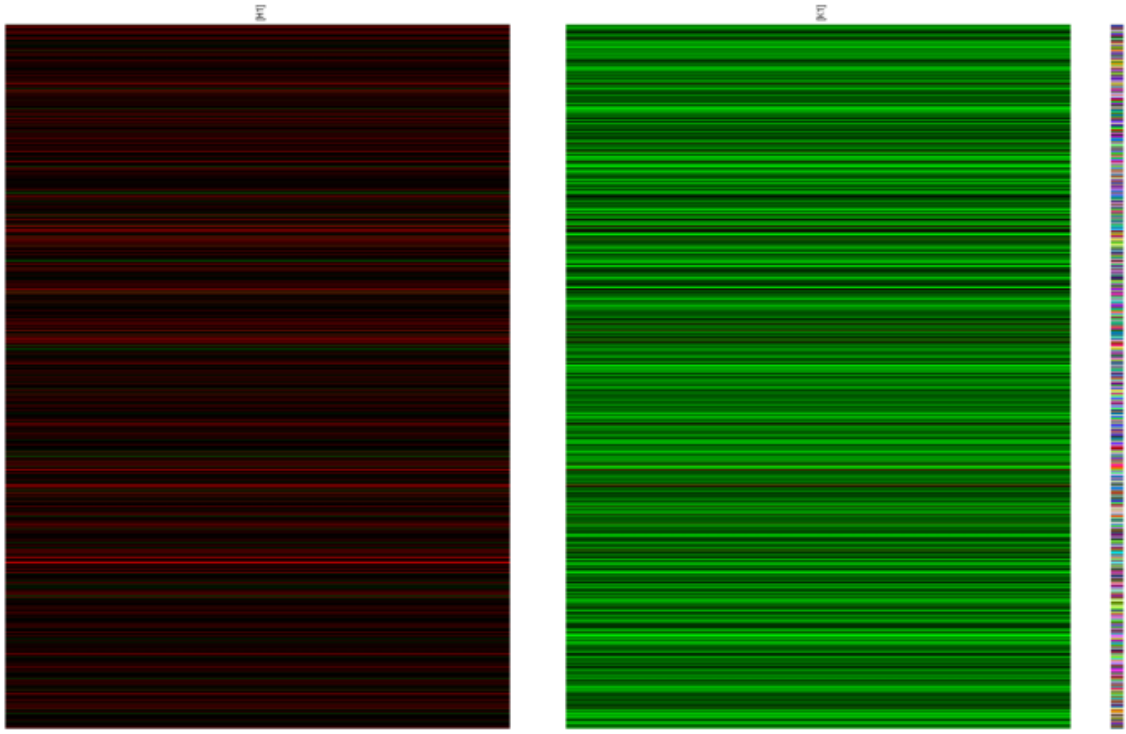
47.323 prob kullanılarak yapılan tüm genom ekspresyon yönteminde vakalarımıza ait tümörlü dokularda, normal dokuya göre ekspresyonu artan ya da azalan prob sayısı 14295 olarak belirlenmiştir. Farklı eksprese olan problemlerin gruplara göre dağılımı şu şekildedir: (Vakalarımıza ait patolojik dokular H (hasta) harfi ile, normal dokular ise K (kontrol) harfi ile gösterilmiştir.)

### 1.Grup: H1&K1

İlk hastaya ait H1 dokusu için kontrol grubu olarak K1 seçildi. Fold Change(FC) değerleri Analiz Grubu/Kontrol Grubu olarak hesaplandı. FC Filtresi 2 olarak belirlendi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1317 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 1231 adet probun ekspresyonu ise kontrol grubuna göre azalmıştır. Up regüle problemlerin sıcaklık haritası Figür 5'te, Down regüle problemlerin sıcaklık haritası Figür 6'da gösterilmiştir. Diğer gruplara ait sıcaklık haritaları da benzer şekildedir.



Şekil 4.7. H1 vs K1 up regüle problemlerin sıcaklık haritası



Şekil 4.8. H1 vs K1 down regüle problemlerin sıcaklık haritası

**Not:** 2 numaralı vaka, radyoterapi alma öyküsü nedeniyle çalışmamızdan çıkarılmıştır.

### **2.Grup: H3&K3**

Kontrol grubu olarak K3 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 2537 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2658 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

### **3.Grup: H4&K4**

Kontrol grubu olarak K4 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 3614 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 3450 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

### **4.Grup: H5&K5**

Kontrol grubu olarak K5 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 2300 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2202 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**5.Grup: H6&K6**

Kontrol grubu olarak K6 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 2168 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2289 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**6.Grup: H7&K7**

Kontrol grubu olarak K7 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 2778 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2655 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**7.Grup: H8&K8**

Kontrol grubu olarak K8 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1062 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 1472 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**8.Grup: H9&K9**

Kontrol grubu olarak K9 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 2453 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2355 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**9.Grup: H10&K10**

Kontrol grubu olarak K10 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1289 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 1517 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**10.Grup: H11&K11**

Kontrol grubu olarak K11 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 2230 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2347 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**11.Grup: H12&K12**

Kontrol grubu olarak K12 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 1959 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 2130 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

**12.Grup: H13&K13**

Kontrol grubu olarak K13 seçildi. Filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, 994 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, 932 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna göre azalmıştır.

Genomdaki tüm mRNA ekspresyon farklılığını saptamak amacıyla 47.323 prob ile yaptığımız çalışmada, patolojik doku ile normal doku arasında 14.295 mRNA'nın ekspresyonunda farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Tüm örneklerimizde ekspresyonu artan mRNA sayısı 258 iken, tüm örneklerimizde ekspresyonu azalan mRNA sayısı ise 117'dir. Tümörlü doku ile normal doku arasındaki ekspresyon farkının en az 1.5[FC(fold change): 1.5] kat olduğu mRNA'lara baktığımızda 11 genin mRNA'sında azalmış ekspresyon, 103 genin mRNA'sında ise artmış ekspresyon ortaya konmuştur. Tümörlü doku ile normal doku arasındaki ekspresyon farklılığının en az 2 kat [FC(fold change): 2] olduğu mRNA'lara baktığımızda ise 22 mRNA'da artmış ekspresyon, 2 mRNA'da azalmış ekspresyon gözlemlenmiştir.

Tablo 4.3 FC 2 kabul edildiğinde down-regüle olan genlerin listesi

Gen Sembol	Gen Adı
CFD	Homo sapiens complement factor D (adipsin) (CFD), mRNA.
ITM2A	Homo sapiens integral membrane protein 2A (ITM2A), mRNA

Tablo 4.4. FC 2 kabul edildiğinde up-regüle olan genlerin listesi

Gen Sembol	Gen Adı
S100A3	Homo sapiens S100 calcium binding protein A3 (S100A3), mRNA.
MMP12	Homo sapiens matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (MMP12), mRNA.
SLC2A1	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1), mRNA.
VSNL1	Homo sapiens visinin-like 1 (VSNL1), mRNA.
CXCL1	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), mRNA.
S100A2	Homo sapiens S100 calcium binding protein A2 (S100A2), mRNA.
MMP1	Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase) (MMP1), mRNA.
LOC400578	PREDICTED: Homo sapiens similar to Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) (LOC400578), mRNA.

KLK6	Homo sapiens kallikrein-related peptidase 6 (KLK6), transcript variant B, mRNA.
KRT17	Homo sapiens keratin 17 (KRT17), mRNA
MGC102966	PREDICTED: Homo sapiens similar to Keratin, type I cytoskeletal 16 (Cytokeratin-16) (CK-16) (Keratin-16) (K16) (MGC102966), misc RNA.
CEP55	Homo sapiens centrosomal protein 55kDa (CEP55), mRNA.
ITGA6	Homo sapiens integrin, alpha 6 (ITGA6), transcript variant 2, mRNA.
ACOT7	Homo sapiens acyl-CoA thioesterase 7 (ACOT7), transcript variant hBACHb, mRNA.
COL4A5	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 5 (COL4A5), transcript variant 1, mRNA.
TP63	Homo sapiens tumor protein p63 (TP63), transcript variant 5, mRNA.
COL4A6	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6 (COL4A6), transcript variant A, mRNA.
FSCN1	Homo sapiens fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus) (FSCN1), mRNA.
LAMC2	Homo sapiens laminin, gamma 2 (LAMC2), transcript variant 1, mRNA.
WDR66	Homo sapiens WD repeat domain 66 (WDR66), mRNA.
IL1F9	Homo sapiens interleukin 1 family, member 9 (IL1F9), mRNA.
KRT6B	Homo sapiens keratin 6B (KRT6B), mRNA.

Tümörlü doku ve normal doku arasında ekspresyonu anlamlı olarak değişen genlerin bulunduğu yolaklar incelendi. Genlerin bulunduğu yolaklar ve ekspresyon değişimleri şu şekildedir:

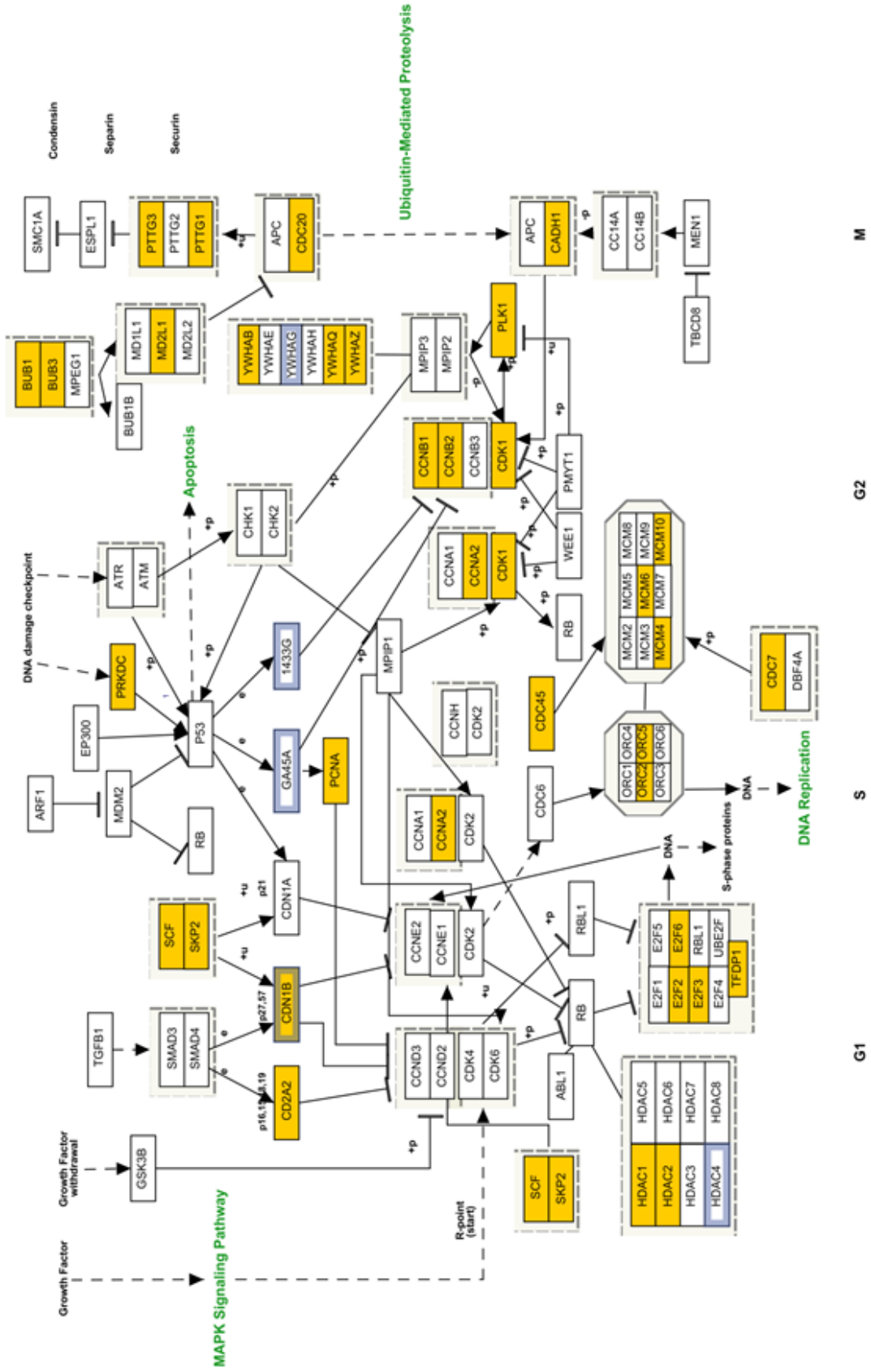
Tablo 4.5. İçerdiği genlerde anlamlı down-regülasyon olan yolaklar

Vaka no	Anlamlı değişim bulunan yolaklar	P değeri	Yolakta etkilenen gen sayısı
H1	Hs_Electron_Transport_Chain_WP111_82216	2,71E-10	39
	Hs_Metabolism_of_carbohydrates_WP1848_83255	6,28E-10	21
	Hs_Oxidative_phosphorylation_WP623_79961	1,16E-10	21

H3	Hs_Electron_Transport_Chain_WP111_82216	8,94E-11	104
	Hs_Fatty_acid_triacylglycerol_and_ketone_body_metabolism_WP1817_83230	1,68E-09	104
	Hs_Leptin_signaling_pathway_WP2034_80016	8,15E-13	76
H4	Hs_Integrin-mediated_Cell_Adhesion_WP185_80036	1,65E-07	24
	Hs_MAPK_Signaling_Pathway_WP382_79951	3,46E-05	28
H5	Hs_Oxidative_phosphorylation_WP623_79961	7,94E-33	34
	Hs_TCA_Cycle_WP78_70014	1,31E-16	14
	Hs_The_citric_acid_(TCA)_cycle_and_respiratory_electron_transport_WP2766_83385	2,27E-23	25
H6	Hs_Adipogenesis_WP236_80209	1,30E-10	46
	Hs_IL-2_Signaling_Pathway_WP49_78543	2,46E-10	15
	Hs_MAPK_Signaling_Pathway_WP382_79951	2,46E-10	32
H7	Hs_Electron_Transport_Chain_WP111_82216	1,02E-34	47
	Hs_Mitochondrial_translation_WP3310_83252	1,13E-12	31
	Hs_The_citric_acid_(TCA)_cycle_and_respiratory_electron_transport_WP2766_83385	5,59E-11	16
H8	Hs_Electron_Transport_Chain_WP111_82216	2,01E-11	23
	Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_83224	2,37E-10	15
	Hs_Respiratory_electron_transport_ATP_synthesis_by_chemiosmotic_coupling_and_heat_production_by_uncoupling_proteins_WP1902_83426	1,35E-10	22
H9	Hs_Energy_Metabolism_WP1541_80210	8,27E-11	18
	Hs_Fatty_Acid_Beta_Oxidation_WP143_79783	6,14E-11	16
	Hs_Signaling_by_Retinoic_Acid_WP3323_83286	3,84E-11	18
	Hs_The_citric_acid_(TCA)_cycle_and_respiratory_electron_transport_WP2766_83385	9,16E-12	20
H10	Hs_Adipogenesis_WP236_80209	6,98E-09	20
	Hs_EGF-EGFR_Signaling_Pathway_WP437_79266	2,65E-07	20
H11	Hs_Electron_Transport_Chain_WP111_82216	1,62E-34	45
	Hs_Fatty_Acid_Beta_Oxidation_WP143_79783	6,70E-14	17
	Hs_The_citric_acid_cycle_and_respiratory_electron_transport_WP2766_83385	8,46E-11	16
H12	Hs_Adipogenesis_WP236_80209	1,53E-10	34
	Hs_Complement_and_Coagulation_Cascades_WP558_79680	4,92E-12	18
H13	Hs_B_Cell_Receptor_Signaling_Pathway_WP23_79985	2,29E-10	18
	Hs_Cell_surface_interactions_at_the_vascular_wall_WP1794_83824	5,00E-08	13
	Hs_Fatty_Acid_Omega_Oxidation_WP206_68882	2,50E-07	6

Tablo 4.6. İçerdiği genlerde anlamlı up-regülasyon olan yollar

Vaka no	Anlamlı değişim bulunan yollar	P değeri	Yolakta etkilenen gen sayısı
H1	Hs_Type_II_interferon_signaling_(IFNG)_WP619_71168	3,14E-11	16
	Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_83224	1,36E-34	32
	Hs_Collagen_biosynthesis_and_modifying_enzymes_WP2725_83130	1,62E-10	21
	Hs_Degradation_of_the_extracellular_matrix_WP2774_83208	5,44E-11	12
H3	Hs_Cell_Cycle_WP179_70629	9,46E-11	34
	Hs_Oxidative_Stress_Induced_Senescence_WP3404_83222	8,37E-11	24
H4	Hs_Cell_Cycle_WP179_70629	4,12E-11	49
	Hs_Retinoblastoma_(RB)_in_Cancer_WP2446_80443	2,91E-26	44
	Hs_MAPK6-MAPK4_signaling_WP3307_83241	2,81E-11	29
	Hs_Regulation_of_DNA_replication_WP1898_83249	1,39E-11	29
H5	Hs_Cholesterol_Biosynthesis_WP197_81059	4,06E-12	11
	Hs_EGF-EGFR_Signaling_Pathway_WP437_79266	2,95E-11	31
H6	Hs_TGF-beta_Signaling_Pathway_WP366_84196	7,77E-09	24
	Hs_Cell_Cycle_WP179_70629	1,85E-10	33
	Hs_Degradation_of_the_extracellular_matrix_WP2774_83208	1,80E-08	12
H7	Hs_Cell_Cycle_WP179_70629	9,84E-11	37
	Hs_Activation_of_gene_expression_by_SREBF_(SREBP)_WP2706_83318	3,62E-10	17
H8	Hs_Cholesterol_Biosynthesis_WP197_81059	3,56E-10	8
	Hs_Degradation_of_the_extracellular_matrix_WP2774_83208	5,43E-12	11
	Hs_Collagen_degradation_WP2708_83358	5,20E-10	11
H9	Hs_Cell_Cycle_WP179_70629	3,80E-11	36
	Hs_Interferon_alpha-beta_signaling_WP1835_83224	1,72E-23	30
H10	Hs_DNA_Replication_WP466_79981	2,13E-13	16
	Hs_G1_to_S_cell_cycle_control_WP45_80001	1,33E-10	18
	Hs_Cell_Cycle_WP179_70629	2,35E-10	31
	Hs_APC-C-mediated_degradation_of_cell_cycle_proteins_WP3557_83447	2,14E-10	22
H11	Hs_MAPK_Signaling_Pathway_WP382_79951	3,64E-10	30
	Hs_TGF-beta_Signaling_Pathway_WP366_84196	4,18E-10	26
	Hs_PRC2_methylates_histones_and_DNA_WP3312_83256	9,08E-11	15
H12	Hs_Degradation_of_the_extracellular_matrix_WP2774_83208	1,85E-11	35
	Hs_Cell_Cycle_Checkpoints_WP1775_83240	7,81E-11	39
	Hs_Gastric_Cancer_Network_1_WP2361_84551	6,09E-11	14
H13	Hs_Arrhythmogenic_Right_Ventricular_Cardiomyopathy_WP2118_71265	1,37E-10	16
	Hs_Collagen_biosynthesis_and_modifying_enzymes_WP2725_83130	2,06E-10	18
	Hs_Extracellular_matrix_organization_WP2703_83106	1,37E-10	18



Şekil 4.9. H3 nolu vakamıza ait hücre siklus yolak örneği  
 Not: Sarı kutucuklar etkilenen genleri göstermektedir

## TARTIŞMA

Baş-boyun tümörleri, dünyada her yıl yaklaşık 700.000 bireyde görülmektedir ve bu insidansla tüm kanserler arasında 6. sırada yer almaktadır. Larenks tümörleri ise baş-boyun bölgesinin en sık görülen kanserlerinden biridir (Yang 2015). Türkiye'deki kansere bağlı erkek ölümlerinin %7'sinden sorumlu olan larenks tümörleri aynı zamanda yüksek mortalite oranlarına da sahiptir (Elci 2003). Tümörün köken aldığı bölgeye, evresine ve uygulanan tedaviye göre değişmekle beraber 5 yıllık sağkalım oranları %52-94 arasındadır (Yang 2015). Oldukça kötü prognoza sahip larenks kanserlerinde, hastalığa erken tanı koyabilmek, klinik gidişi tahmin edebilmek ve kişiselleştirilmiş hedefe yönelik optimal tedaviyi sağlayabilmek amacıyla klinik ve genetik belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Geçmiş yıllarda bu ihtiyacı karşılamak amacıyla larenks kanserli bireylerde belli genlerin ekspresyonuna bakan çalışmalar yapılmıştır ancak tüm genomu kapsayan araştırmalar oldukça nadirdir. Çalışmamızda larenks kanser tanısı almış vakalardan taze doku örnekleri alınarak, genomda eksprese olan tüm mRNA'lar incelenmiş ve kanserli dokuda ifadesi artan ya da azalan genler belirlenmiştir. Böylece tüm genom incelenerek larenks kanser tanısını kolaylaştırabilecek, prognoz tayinine yardımcı olabilecek ve hedefe yönelik kişiselleştirilmiş tedavi için hedef olabilecek aday genler belirlenmeye çalışılmıştır.

Erişkin malignitelerinin %2'sini oluşturan larenks kanserlerinin erkeklerde görülme sıklığı %2.2 iken, bayanlarda görülme sıklığı %0.4'dür. Bu oranlarla tüm kanserler arasında erkek/kadın oranı en yüksek olanıdır (Lazaris 2000, Rosai 1996). En sık 5-7. dekadlar arasında görülen larenks kanserinin 30 yaşın altında görülme sıklığı ise %1'dir. Bizim çalışmamızdaki tüm vakaların erkek olması ve yaş ortalamalarının 60,8 olması, larenks kanserlerinin daha çok ileri yaş erkeklerde görüldüğünü desteklemektedir.

Larenks kanserlerinin etiyolojisinde birçok çevresel faktörün ve genin birbiriyle etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Bilinen en önemli çevresel risk faktörü sigara olan larenks tümörlerinin genetik temelini ise oldukça karmaşık olduğu bilinmektedir (Parkin 2011). Çalışmamıza dahil ettiğimiz 12 vakanın 11'inde sigara kullanım öyküsünün olması ve örneklerimizde ekspresyonu değişen birçok genin bulunması, larenks kanserlerinin etiyolojisinde sigaranın ve genetik değişimlerin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Larenks bölge tümörleri histolojik olarak incelendiğinde, tümörlerin %95'ini skuamöz hücreli kanserlerin oluşturduğu görülmektedir (Batsakis 1992). Skuamöz hücreli karsinomlar ise lokalizasyonuna göre 4 alt tipe ayrılmaktadır. Tümörlerin yaklaşık %50-

60'ı glottik bölge kaynaklı iken, bunu %30-40 oranla supraglottik bölge tümörleri izler. Subglottik ve transglottik bölge kaynaklı tümörler ise vakaların %5'inden daha azını oluşturmaktadır (Mastronikolis 2009). Bizim çalışmamızda olguların 3'ünde (%25) supraglottik, 5'inde (%41) glottik, 4'ünde ise transglottik (%33) bölge tümörü mevcuttur ve vakaların hepsi histolojik olarak skuamöz hücre ile uyumludur. Olgularımızın tümör lokalizasyonu ve histopatolojik dağılımı literatür verileri ve larenks kanserine ait genel bilgilerle örtüşmektedir.

Larenks kanseri vakalarında en çok çalışılan genlerden biri **EGFR**'dir. EGFR, hematopoetik hücreler hariç normalde düşük seviyelerde eksprese olmaktadır. Ekspresyon artışı ise ilk olarak skuamöz hücreli A431 vulvar karsinomlarda gösterilmiştir ve bu artış gen amplifikasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Ullrich 1984). Ancak baş-boyun kanserlerinde yapılan çalışmalarda amplifikasyon olmaksızın genin ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle kanser oluşumu ile gen amplifikasyonunun doğrudan ilişkili olmadığı, altta yatan asıl mekanizmanın mRNA overekspresyonu olduğu düşünülmektedir. EGFR mRNA overekspresyonu skuamöz hücreli karsinomların çoğunda karşımıza çıkmaktadır ve larengeal skuamöz hücreli karsinomlarda bu oran daha önceki çalışmalarda %67-87,5 arasında bulunmuştur (Irish 1993, Wei 2008). Yüksek EGFR mRNA seviyeleri, kötü prognozla, agresif seyirli tümörle ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Wei ve arkadaşlarının larenks kanser tanılı 40 vaka ile yaptığı çalışmada olguların %87.5'inde overekspresyon gözlenirken, %82.5'inde ise lenf nodu metastazı saptanmıştır (Wei 2008). Almadori ve arkadaşları ise larengeal skuamöz hücreli karsinoma sahip 140 hasta ile yaptığı çalışmada EGFR seviyelerinin lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğunu ve 5 yıllık sağkalım süresinin EGFR + hastalarda %15 iken, EGFR – hastalarda %66 olduğunu ortaya koymuşlardır (Almadori 1999). Bizim çalışmamızda 12 vakanın 11'inde (%91) EGFR mRNA seviyeleri normal dokuya göre yüksek olarak saptanmış ve en yüksek mRNA seviyesi, lenf nodu metastazı bulunan evre 3 tümöre sahip 12 numaralı vakada ortaya çıkmıştır. Bu durum EGFR mRNA ekspresyonunun larenks kanserlerinde önemli ölçüde arttığını ve lenf nodu metastazı ile ekspresyon artışının ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

**CCND1 (siklin D1)**, PRAD1 onkogeni tarafından kodlanan bir proteindir ve hücre döngüsünün G1-S geçiş noktası için önemlidir. Geçmiş yıllardaki çalışmalarda meme kanseri ve baş-boyun kanserlerinde PRAD1 geninde amplifikasyon saptanmıştır. Jares ve arkadaşları 46 skuamöz hücreli larenks karsinomuna sahip hasta ile yaptığı çalışmada

vakaların %37'sinde amplifikasyon saptarken, %35'inde ise siklin D1 overekspresyonu gözlemiştir. Amplifikasyon ve protein overekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunan çalışmada, her iki durum da ileri evre kanser, lenf nodu metastazı ve lokal invazyon ile ilişkili bulunmuştur (Jares 1994). İncelediğimiz 12 vakanın 11'inde (%91) kanser dokusunda normal dokuya göre ekspresyonu artan siklin D1, lenf nodu metastazı bulunan ve evre 4 olan 7 numaralı vakamızda normal dokuya göre 7 kat artmış ekspresyona sahiptir. Bu durum literatür bilgileri ile uyumludur.

Hücre döngüsünün önemli proteinlerinden biri de **siklin E**'dir. Siklin E'nin larenks kanserlerindeki önemi 2000'li yıllara kadar bilinmemiştir. İlk çalışmayı Dong ve arkadaşları 2000 yılında 102 skuamöz larenks kanser tanılı hasta ile yapmışlardır. Hastaların %52,9'unda (54 vaka) overekspresyon saptanmış ve bu durum tümör boyutu, tümör yeri, kötü differansiasyon, lenf nodu metastazı ve ileri evre ile ilişkilendirilmiştir. Overekspresyon saptanan 54 vakanın 37'sinde tümörün supraglottik bölge yerleşimli olması nedeniyle siklin E ekspresyon artışının daha çok supraglottik tümörlerde ortaya çıktığı düşünülmektedir(Dong 2000). İncelediğimiz 12 vakanın tamamında siklin E overekspresyonu mevcuttu ancak siklin E seviyesi ile tümör yeri, boyutu, farklılaşması ve uzak metastaz arasında ilişki saptanamadı.

Hücrenin G1-S geçişinde, DNA sentez regülasyonunda ve hücre proliferasyonunda görev alan **PCNA** bir proliferasyon markırıdır ve larenksin skuamöz hücreli karsinomlarında ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur (Sarac 1998). Liu ve arkadaşları 22 supraglottik larenks kanser vakası ile yaptığı çalışmada PCNA ekspresyonu ile lenf nodu metastazı arasında pozitif korelasyon saptarken, hücre farklılaşması ve PCNA ekspresyonu arasında ise zıt ilişki bulmuşlardır. Ancak küçük bir grup üzerinde yapılan bu çalışmada PCNA seviyesi ile tümör evresi arasında ilişki bulunamamıştır (Liu 1997). Vakalarımızın tamamında PCNA overekspresyonu bulunmasına rağmen en yüksek PCNA değerlerinin evre 1 kansere sahip olan 4 numaralı vakamızda ortaya çıkması da bu çalışmayı desteklemektedir. Siklin E ve PCNA ekspresyon artış birlikteliğinin prognozu kötü yönde etkileyerek sağkalım süresini azalttığını belirten yayınlar da mevcuttur (Dong 2000).

**RAS** gen ailesi tarafından kodlanan RAS proteinleri GTPaz aktivitesine sahiptir ve hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili birçok yolda görev almaktadır (Williams 2000). Birçok kanserde RAS gen mutasyonu suçlanmasına rağmen, larenks karsinomlarında daha çok RAS protein seviyesindeki artış karşımıza çıkmaktadır.

Yarbrough ve arkadaşlarının 51 hasta ile yaptığı çalışmada K-RAS, H-RAS ve N-RAS bölgelerinde mutasyon saptanmazken, en çok N-RAS'ta olmak üzere tüm RAS proteinlerinde artış gözlenmiştir (Yarbrough 1994). Ancak RAS değerleri ile hücrel farklılaşma ve tümör evresi arasında ilişki bulunamamıştır. Örneklerimizin tamamında N-RAS overekspresyonu ve 12 vakanın 10'unda K-RAS ve H-RAS overekspresyonu mevcuttur. Ancak ekspresyon çalışması yaptığımız için bu bölgedeki mutasyon durumu bilinmemektedir. Bulgularımız birçok kanserde olduğu gibi larenks kanserlerinde de RAS protein ailesinin etkili olduğunu desteklemektedir.

Birçok kanser hücresinin invazyon ve metastazındaki ilk aşama bazal membran yıkımıdır. Bazal membranın temel yapıtaşı tip IV kollajendir. Genetik olarak birbirinden farklı 6  $\alpha$  zincirinden oluşan,  $\alpha 1(IV)$ -  $\alpha 6(IV)$ , tip IV kollajen  $\alpha 5$ -  $\alpha 6$  zincirleri (**COL4A5-COL4A6**) Xq22 bölgesine lokalizedir. Ikeda K ve arkadaşları kolorektal kanserli vakalar ile yaptıkları çalışmada COL4A5 ve COL4A6'da ekspresyon kaybı gözlemiş ve bunun sebebinin de genlerin promotor bölgelerindeki hipermetilasyon olduğunu saptamışlardır (Ikeda 2006). Baba Y ve arkadaşları (2008) ise özefagus kanserli vakalarla yaptıkları çalışmada iyi differansiye tümörlerde COL4A5 VE COL4A6'nın daha yüksek seviyelerde olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmalarımıza göre larenks kanser vakalarında COL4A5 ve COL4A6 gen değişimi hakkında çalışma bulunmamaktadır. Bizim vakalarımızın tamamında COL4A5 ve COL4A6'nın ekspresyonu anlamlı derecede artış göstermiştir. Her iki genin de orta derecede differansiye H3 vakasında en yüksek değerlere ulaştığı da dikkat çekmektedir.

Bazal membranın non-kollajen yapıtaşlarının başında, ekstrasellüler glikoprotein ailesinden olan laminin proteini gelmektedir. Lamininler; hücre adezyonu, farklılaşması, migrasyonu, sinyalizasyon ve metastaz gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol alır. Yapılarında 3 zincir bulunur: alpha, beta ve gamma. **Laminin gamma 2(LAMC2)**, özellikle fetal dönemde eksprese olarak dokular içerisindeki hücre organizasyon ve migrasyonunu sağlar. Ayrıca deri, akciğer ve böbrek epitelinde de eksprese olur. Eritelleri bazal membrana bağlayan ankorin filamentlerinin de yapısına katılarak epitel bütünlüğünün sağlanmasında görev alır. Gendeki mutasyon epidermolizis bulloza olarak kliniğe yansımaktadır (Web 6). LAMC2 gen ekspresyonunun larenks kanser vakalarındaki değişimine bakıldığında; 8 skuamöz larenks kanser vakası ve 8 kontrol ile yapılan tüm genom ekspresyon çalışmasında LAMC2 geninde anlamlı overekspresyon saptanırken; 29 larenks karsinom vakası ve 13 kontrol vakası ile yapılan bir diğer çalışmada da kanserin

erken ve ileri evresinde LAMC2’de anlamlı ekspresyon artışı saptanmıştır (Hui 2015, Ma 2009). Çalışmamızdaki bütün vakaların kanser dokularında LAMC2 ekspresyon artışı literatürü desteklemektedir.

Tümör invazyon ve metastazının ilk basamağı olan bazal membran yıkımı proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Larengeal karsinomlarda ilk aktivitesi gösterilen proteolitik enzim kollejenazlardır (Abramson 1975). Sonrasında tanımlanan önemli enzimlerden biri ise **matriks metalloproteinaz(MMP)**’lardır. MMP ailesinin şimdiye kadar keşfedilen 21 üyesi bulunmaktadır (Vihinen 2002). **MMP13** (kollajenaz 3) Freije ve arkadaşları tarafından ilk olarak meme kanserinde tanımlanmıştır (Freije 1994). Cazorla ve arkadaşları ise 35 larenks karsinomlu hasta ile yaptıkları çalışmada vakaların %57’sinde (20/35) MMP13’te ekspresyon artışı saptarken, 35 kontrol dokusunun hiçbirinde ekspresyon gözlememişlerdir. Bu çalışmada MMP13 artışı, lokal invazyon ve histolojik farklılaşma ile ilişkili bulunurken; lenf nodu metastazı, tümörün evresi ve uzak metastaz ile korelasyon saptanmamıştır (Cazorla 1998). Histolojik farklılaşmada etkili olduğu bilinen MMP13 daha çok iyi differansiye tümörlerde karşımıza çıkmaktadır (Nadal 2003). Bizim çalışmamızda ise 12 vakanın 11’inde MMP13 ekspresyonu normal dokuya göre artmıştı ancak MMP13 seviyesi ile tümör boyutu, evresi ve uzak metastaz arasında anlamlı ilişki bulunamadı.

Tip I ve III kollajeni parçalayan ve kollajenaz I olarak da bilinen **MMP1**’in ekspresyonunun kolorektal kanser, gastrik kanser, özefageal kanser, metastatik melanom ve pankreatik adenokanser gibi kanser türlerinde arttığını gösteren yayınlar mevcuttur (Murray 1996, Inoue 1999, Ito 1999, Yamashita 2001, Nikkola 2002). Krecicki ve arkadaşları 50 larenks skuamöz hücre karsinomlu hasta ile yaptıkları çalışmada vakaların %72’sinde immunohistokimyasal yöntemlerle MMP1 varlığını göstermişlerdir. MMP1 seviyesi ile hastanın yaşı, tümör boyutu, lenf nodu metastazı ve farklılaşma arasında ilişki bulunamamıştır. Ancak keratinize tip larenks kanserlerinde, non-keratinize olanlara göre MMP1 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu durum MMP1 ile tümör histolojik tipi arasında korelasyon olabileceğini göstermektedir (Krecicki 2003). Magary ve arkadaşları 8 larengeal ve farengeal skuamöz hücreli kansere sahip vaka ile yaptığı çalışmada 8 vakanın 6’sında MMP1 over-ekspresyonu gözlemişlerdir (Magary 2000). Vakalarımızın tamamında MMP1 ekspresyonu anlamlı derecede (FC>2) yüksek bulunmuştur ve bu durum larenks kanserlerinde MMP1 ekspresyonunun önemli olabileceğini göstermektedir. Daha çok sayıda hasta ile yapılan çalışmalarla bu

bulgumuzun desteklenmesi gerekse de, yalnızca larenks kanserli vakaları kapsayan ve mikroarray yönteminin kullanıldığı özgün tez çalışmamız larenks kanser belirteci olabilecek aday bir genin belirlenmesi açısından literatüre büyük katkı sağlamaktadır.

Vakalarımızın tamamında anlamlı derecede ekspresyonu artan genlerden biri de **MMP12**'dir. MMP12, ilk olarak sigara içen bireylerin alveol makrofajlarında gösterilmiştir. Sonrasında ise kutanöz SCC vakalarında over-eksprese olarak bulunmuştur (Shapiro 1993, Kerkelä 2000). Liu ve arkadaşları 30 supraglottik larenks karsinomuna sahip vaka ile yaptığı çalışmada tümör-normal doku arasında ve metastatik-nonmetastatik tümörler arasında MMP12 ekspresyonu açısından farklılık gözlemiştir. Ancak tümör evresi ile ilişki saptanmamıştır (Liu 2006). Larenks kanser oluşum ve metastazında etkisi olduğu düşünülen ve bizim tüm vakalarımızda artış gösteren MMP-12'nin larenks kanserinin önemli belirteçlerinden olabileceği düşünülmektedir.

**MMP9**, 74 baş-boyun tümörüne sahip vaka ile yapılan bir çalışmada vakaların %82'sinde pozitifken, %39'unda ise yoğun pozitif bulunmuştur. MMP9 protein seviyesi ile tümör evre ve farklılaşması arasında ilişki saptanamayan çalışmada MMP9(-) vakalarda 5 yıllık sağkalım %92 iken, MMP9(+) vakalarda bu oranın %45'lere indiği gösterilmiştir. Ayrıca MMP9(+) vakalarda relaps oranları da oldukça yüksek saptanmıştır. Vakaların %33'ünde lokal relaps, %52'sinde lenf nodu relapsı ve %60'ında hematolojik relaps gözlenmiştir (Ruokolainen 2004). Çalışmamızda tümörlü doku ile normal dokular arasında MMP9 ekspresyonu açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Epitel hücrelerinin farklılaşmasında görev alan proteinleri kodlayan genler epidermal farklılaşma kompleksini (EDC) oluşturmaktadır. Bu genler başlıca 3 aileden oluşur ve S100 proteinleri bu gen ailesinin kodladığı proteinlerden biridir. 21 üyesi bulunan S100 proteinleri, 1q21 bölgesine lokalizedir. Atopik dermatit, psöriazis, hiperkeratoz gibi deri hastalıklarında önemli olduğu bilinen bu moleküller, bazı skuamöz hücreli karsinomlarda da karşımıza çıkmaktadır. Sigara maruziyeti bulunan özefageal kanserlerde **S100A3** gen amplifikasyonundan daha önceki yayınlarda bahsedilmiş ancak baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlarda S100A3 overekspresyonu ilk kez 2014 yılında Tyszkiewicz ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Chattopadhyay 2010, Tyszkiewicz 2014). 14 larengeal karsinomlu vaka ile yapılan çalışmada epidermal farklılaşma kompleksini oluşturan genlerden olan **LCE3D** ve **SPRR2G**'de de ekspresyon artışı saptanmıştır. FC değerleri 1.65 ile 8.27 arasındadır. Bizim çalışmamızda ise vakaların tamamında S100A3 overekspresyonu gözlenirken, 12 vakanın 11'inde ise SPRR2G ve

LCE3D genlerinde overekspresyon gözlenmiştir. FC değerleri şu şekildedir; **S100A3**: 2.18-22.7, **SPRR2G**: 1.01-145.6, **LCE3D**: 1.04-92.5 (Tyszkiewicz 2014). EDC kompleksinin üyelerinden biri de S100A2 proteinidir. **S100A2**, diğer S100 proteinlerinin aksine birçok kanserde down-regüle olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu nedenle tümör supresör fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Deri, akciğer, böbrek ve prostat kanserlerinde azalmış ekspresyonu saptanan S100A2, kötü prognoz belirteci olarak kabul edilmektedir (Ilg 1996). Ancak baş-boyun bölge tümörlerinde S100A2 proteininde overekspresyondan bahseden yayınlar mevcuttur (Villaret 2000). 62 larengeal karsinomlu hasta ile yapılan bir çalışmada vakaların 40'ında immunohistokimyasal yöntemlerle S100A2 pozitifliği saptanmıştır. İyi differansiye tümörlerin (G1-G2) %95'inde pozitiflik gözlenirken, kötü differansiye tümörlerde bu oran %51 olarak bulunmuştur. 5 yıllık sağkalım oranları ve relaps olmadan geçen sürenin de S100A2 pozitifliği bulunan hastalarda daha uzun olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra 62 vakanın 54'ünde **CK14 (Sitokeratin 14-LOC400578)**, 56'sında ise CK17 pozitifliği saptanmış ve bu durumun S100A2 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu kararlaştırılmıştır (Lauriola 2000). Vakalarımıza baktığımızda S100A2 ve CK14'ün tüm vakalarda anlamlı olarak artış gösterdiğini görmekteyiz. FC değerleri ise şu şekildedir; S100A2: 4.02-38.5, CK14: 8.8-156.4.

S100 protein ailesinin bir diğer üyesi de **S100A7**'dir. Baş-boyun kanserli vakalarda değişime uğradığı bilinen S100A7, baş-boyun tümörlü 100 vaka ile yapılan bir çalışmada vakaların %67'sinde pozitif olarak saptanmış ve bu durum kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Tripathi 2010). Çalışmamızda ise S100A7 mRNA seviyesi tüm vakalarda artmış olarak gözlenmiştir ve FC değerleri 1.19-113.3 arasındadır.

Çalışmamızda tüm vakaların tümör dokularında ekspresyonu anlamlı derecede (FC>2) artan genlerden biri de **SLC2A1**'dir. Bu gen memelilerde glukoz transportunda görevli GLUT 1(glukoz transporter 1) proteinini kodlar ve kanser tedavisi araştırmalarındaki odak noktalarındandır (Luo 2010). Larenks skuamöz hücre karsinomuna sahip 106 vaka ile yapılan bir çalışmada vakaların %83,9'unda SLC2A1 ve %82,1'inde SLC2A3 overekspresyonu gözlenmiştir (Starska 2015). Malign hücrelerin aktivasyonunda çok önemli rolü olan glukozun hücre içine transportunun artışı ve glikolitik yollardaki aktivitelerin radyorezistans ve kemorezistansla ilişkisi, SLC2A1 gen ekspresyon artışını kötü prognoz belirteci haline getirmektedir (Yan 2013). Zhou ve arkadaşlarının 38 baş-boyun tümörlü vaka ile yaptıkları çalışmada vakaların 30'unda ekspresyon artışı saptanmış

ve bu durum lenf nodu metastazı, ileri evre kanser ve kısa yaşam süresi ile ilişkili bulunmuştur (Zhou 2008). SLC2A1 ekspresyonunun tüm vakalarımızda artışı literatürü desteklerken, SLC2A3 gen ekspresyonunda anlamlı değişiklik saptanmamıştır.

Nöronal kalsiyum sensör proteinlerinden biri olan **Visinin like protein-1 (VSNL1, VILIP1)** nöronlarda kalsiyum aracılıklı sinyal iletiminde rol alarak hücre sinyalizasyonu ve farklılaşmasında görev alır (Akagi 2012). Çoğunlukla merkezi sinir sistemi hücrelerinde eksprese olan bu protein, embriyonik böbrek hücrelerinde, pankreatik beta hücrelerinde ve bazı deri tümörlerinde de gösterilmiştir. Mahloogi ve arkadaşları tarafından özefagus kanserli vakalarla yapılan çalışmada tümör süpresör olarak tanımlanan bu gen, Xie ve arkadaşları tarafından nöroblastomlu vakalarla yapılan çalışmada ise onkogen olarak tanımlanmaktadır (Mahloogi 2003, Xie 2007). Alzheimer ve bazı nörodejeneratif beyin hastalıkları için belirteç olarak kullanılan VSNL1'in larenks kanser vakalarındaki değişimleri ile ilgili şu ana kadar yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda vakaların tamamında VSNL1 gen ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır (FC: 1.94-8.30). Bu durum VSNL1 geninin larenks kanser vakaları için de önemli bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Kanser oluşum mekanizmalarından biri de kemokinlerin sebep olduğu inflamasyondur. Nötrofil kemoatraktantı olan ve inflamasyonda rol oynayan **CXCL1** proteini bu kemokinlerden biridir. CXCL1 melanom hücrelerinden sekrete edilen ve melanoma patogenezinde suçlanan, mitojenik, anjiogenik ve tümörogenik özelliği olan bir gendir (Haghnegahdar 2000). Hendrik ve arkadaşlarının daha önce radyoterapi almış vakalarda dil, ağız florası ve epidermal keratinositlerden elde ettikleri kanser hücre dizilerinde yaptıkları çalışmada, CXCL1 ekspresyonunda normal dokuya göre 2 kattan fazla ekspresyon artışı saptanmıştır (Wolff 2011). Baş-boyun bölgesi tümörlerine yönelik çalışma literatürde mevcut olmasına rağmen, araştırmalarımıza göre larenks kanserindeki CXCL1 gen değişimi hakkında veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda tüm vakalarda FC: 2,07-13,1 olmak üzere CXCL1 gen ekspresyonunda artış mevcuttur. Tümörogenik etkisi olduğu bilinen bu genin larenks kanser etiolojisinde de etkili olabileceği çalışmamızda gösterilmiştir ancak vaka sayısı daha yüksek olan çalışmalarla bu durumun desteklenmesi gerekmektedir.

Vakalarımızın tamamında ekspresyonu anlamlı derecede artan proteinlerden biri de IL36G(interleukin 36 gamma) geni tarafından kodlanan **IL1F9 (interleukin 1 family, member 9)**'dur. IL1 sitokin ailesinin bir üyesi olan IL1F9 proteini, IL1RL2 (interleukin 1

receptor-like 2) aracılığıyla PI3K/AKT yolağını ve NF-kappa B yolağını aktive eder. Bu yolun aktivasyonu sonucunda hücre büyümesi, farklılaşması ve hücre yaşam süresi artarken; apoptoz baskılanır. Birçok kanserin altta yatan mekanizmalarından olan hücre çoğalmasının artışı ve apoptozisinin baskılanması baş-boyun tümörlerinde de kendini göstermektedir (Bussink 2008, Coló 2011). Baş-boyun karsinomlu vakaların büyük kısmında aktive olduğu bilinen bu yolağın yapılan 4 ayrı çalışmadaki aktivasyon oranları %35-92 arasındadır. Yolak aktivasyonunun baş-boyun kanserlerindeki önemli tedavi yöntemlerinden biri olan radyoterapiye karşı direnç oluşturduğu, bu yolağı hedefleyen tedavi yöntemlerinin ise hasta yaşam süreleri üzerinde etkili olabileceği de çalışmalarda belirtilmektedir (Bussink 2008).

**Kallikrein-ilişkili peptidaz 6 (KLK6)**, tripsin veya kimotripsin benzeri aktivite gösteren serin proteaz ailesinin bir üyesidir (Borgono 2004). Ekstrasellüler matriksi parçalayabilen KLK6; inflamasyon, reseptör aktivasyonu ve apoptoz regülasyonu gibi hücrenel süreçlerde görev alır. KLK6 ekspresyon kaybı ile hücreleri bir arada tutan e-kaderin yapısı bozulur ve çekirdekte biriken B katenin etkisiyle epitelyal-mezenşimal dönüşüm (EMT) gerçekleşir. Böylece hücrelerin proliferasyonu, motilitesi artar ve radyoterapiye direnç ortaya çıkar (Schrader 2015). Birçok kanserde ekspresyonunun bozulduğu bilinen KLK6, erken tanı amaçlı ya da kötü prognoz belirteci olarak kullanılabilir (Bayani 2012). Baş-boyun tümörüne sahip 162 vaka ile yapılan bir çalışmada vakaların % 42.6'sında KLK6'da ekspresyon artışı saptanmış ve bu artış iyi prognoz belirteci olarak kabul edilmiştir (Schrader 2015). Bizim çalışmamızda ise vakaların tamamında FC: 2.2-56.5 olmak üzere ekspresyon artışı mevcuttu.

Deri bütünlüğünün sağlanması ve güçlendirilmesinde görevli bir diğer gen de **ITGA6 (integrin, alpha 6)**'dır.  $\alpha6\beta4$  ve  $\alpha6\beta1$  integrini kodlar. İntegrinler, hücre-hücre etkileşimini ve hücre-matriks etkileşimini sağlayan proteinlerdendir. Ayrıca hücre büyümesini ve belirli genlerin aktivitesini düzenleyen kimyasal sinyalleri de iletme görevleri vardır.  $\alpha6\beta4$  integrin primer olarak vücut boşluklarındaki epitellerde bulunur ve epidermisin altında bulunan tabakaya bağlanmasını sağlayan hemidesmozomun yapısına katılır.  $\alpha6\beta1$  integrin ise fetal dönemde organ ve dokuların şekillenmesinde görev alır. İntegrinlerin aktivasyon ve lokalizasyon değişikliklerinin kanser progresyonunda etkili olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur. İntegrinler kanser hücrelerinin invazyon ve metastazını sağlayacak anahtar yolları aktive edebileceği gibi apoptoz önleyici yolları da aktive edebilmektedir. Bu moleküllerin sadece invazyon aşamasında değil kanser

oluşum aşamasında da etkili olabileceği düşünülmektedir (Web 7). Choi ve arkadaşlarının baş-boyun tümörlü olgularda yapılan mikroarray çalışmalarını bir araya getirdiği bir metaanaliz çalışmasında ITGA6 geninin baş-boyun tümörlerinde up-regüle olduğu gözlenmiştir (Choi 2005). Kuriakose MA arkadaşlarının yaptığı çalışmada da ITGA6 geninde baş-boyun tümör dokularında, normal dokuya göre 2.8 katlık ekspresyon artışı saptanmıştır (Kuriakose 2004). Çalışmamıza dahil olan tüm vakalarda saptadığımız ekspresyon artışı da bu çalışmaları desteklemektedir.

Vakalarımızın tamamında anlamlı derecede ekspresyonu artan genlerden biri de **FSCN1 (fascin homolog 1)** genidir. Aktin filamentlerini birbirine bağlayan proteinlerden olan fascin, hücre membran çıkıntılarının oluşumunda ve hücre motilitesinde görevlidir. Normalde nöronlar, lenfoid dokunun foliküler dendritik hücreleri, çok katlı skuamöz epitelyaların bazal membranında, mezenşim ve vasküler endotel hücrelerde eksprese olur (Zhang 2008). Birçok kanserde ekspresyon artışı gözlenen FSCN1 geninin oral ve orofarengeal karsinoma sahip 129 vaka ile yapılan çalışmada vakaların % 30.2'sinde zayıf eksprese, %58.9'unda orta derecede eksprese ve %10.9'unda yoğun eksprese olduğu tespit edilmiştir. Fascin protein ekspresyon seviyesi ile tümör boyutu, klinik evre, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (Chen 2007). Araştırmalarımıza göre larenks kanser vakalarının FSCN1 ekspresyonu açısından analiz edildiği özgün bir çalışma bulunmamaktadır. Vakalarımızın tamamındaki FSCN1 ekspresyon artışı, larenks kanser vakalarında da FSCN1 geninin önemini vurgulayan ön çalışma olması açısından oldukça önemlidir.

Hücre iskelet oluşumuna katılan ara filaman proteinlerinden olan **CK16 (sitokeratin 16)**, tüm vakalarımızda ekspresyonu artan genlerdendir. Farklı organlardaki epitel hücreler farklı sitokeratin gruplarını eksprese eder ve bu ekspresyon malign dönüşüm boyunca modifiye edilebilir (Cohen-Kerem 2002). Larenks skuamöz hücreli karsinoma sahip 17 vaka ile yapılan çalışmada vakalarda CK16'da ekspresyon farkı saptanmamış ancak Van Der Velden ve arkadaşlarının baş-boyun tümörüne sahip vakalarla yaptıkları çalışmada CK16 ekspresyonu premalign lezyonlarda artmış olarak saptanmıştır (van der Velden 1993).

**TP63**; transkripsiyon ailesinden olan P53 ailesinin bir üyesini kodlayan, çok katlı epitelyal dokuların gelişim ve korunmasında önemli rolü olan bir genidir. Gendeki mutasyonlar EEC3 (Ektrodaktili, ektodermal displazi ve yarık damak dudak) sendromu ve SHFM (split-hand/foot malformation 4) gibi klinik durumlarla ilişkilidir (Mills 1999, Yang

1999). Yapısal ve fonksiyonel olarak P53 gen homoloğu olan TP63, DNA bağlama yeteneğine sahiptir ve P53 duyarlı genleri aktive ederek apoptozisi indükler (Levrero 2000). Tümör süpresör etkilerinden bahseden yayınlar olduğu gibi, onkogenik etkisi olduğunu belirten yayınlar da mevcuttur. Bu nedenle P63 ekspresyonundaki her türlü değişimin tümörogenik etkisinin olduğu düşünülmektedir (Pruneri 2002). Larenks skuamöz hücreli karsinoma sahip vakalarla yapılan bir çalışmada larengeal tümörogenezisin erken aşamalarında P63 gen ekspresyonunda azalma saptanmıştır. Ancak bizim vakalarımızın tamamında TP63 ekspresyonu anlamlı derecede artmaktadır ve bu durum TP63'ün ekspresyonundaki artış ve azalışın tümörogenik olabileceği yönündeki yayınları desteklemektedir. Ayrıca TP63 geninin lokalize olduğu 3q24-27 bölgelerinin larenks kanser vakalarının çoğunda amplifikasyona uğradığını gösteren yayınlar da çalışmamızı destekler yöndedir (Speicher 1995).

**KRT17 (keratin 17)**; saç, deri, tırnak ve benzer dokularda eksprese olan fibröz yapıdaki proteindir. Ayrıca cilt yağ bezlerinde yer alarak sebum üretimini sağlar. KRT17, keratin ara filamentleri oluşturmak için benzer yapıda protein olan **KRT6B (keratin 6B)** ile kompleks oluşturur. Bu yoğun ağlar deri, tırnak ve diğer dokulara dayanıklılık ve esneklik sağlar. Yoğun ara filamentler aynı zamanda bu dokuları fiziksel stres ve hasarlardan korur. KRT17 ve KRT6B ayrıca yara iyileşmesinde görev alan proteinlerdendir (Web 8, 9, 10). KRT6B: baş-boyun tümörleri, deri tümörleri, servikal, akciğer ve ürotelyal tümörlerde yüksek seviyelerde eksprese olurken; KRT17: servikal, baş-boyun, ürotelyal, ovaryal, pankreas, deri ve akciğer kanserlerinde yüksek seviyelerde eksprese olmaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda larenks kanser vakaları üzerinde KRT6B ve KRT17 gen etkisini gösteren özgün bir çalışma bulunmamaktadır. Vakalarımızın tamamında her iki genin mRNA seviyelerindeki anlamlı artış bu moleküllerin larenks kanser oluşum ve prognozunda etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre bölünmesinin son aşaması olan sitokinezde görevli moleküllerden biri de **CEP55** (centrosomal protein 55kDa)'dir. Kromozomların sentromer bölgesinde lokalize olan bu protein, baş-boyun bölge tümörlerinde up-regüle olan FOXM1 onkogeninin hedef bölgesi olarak tanımlanmıştır (Gemenetzidis 2009). Ayrıca CEP55 overekspresyonu oral skuamöz hücreli tümörlerin agresivitesi ile direk olarak ilişkili bulunmuştur (Chen 2009). Larenks skuamöz hücreli karsinoma sahip 29 vaka ve 13 kontrol vakası ile yapılan çalışmada CEP55 ekspresyonu tümörün erken ve ileri evrelerinde overeksprese olarak

bulunmuş ve hücre siklusunda görevli CEP55 onkogen olarak tanımlanmıştır (Hui 2015). Bizim vakalarımızın tamamındaki CEP55 overekspresyonu da literatürü desteklemektedir.

**WD repeat protein ailesi**; sinyal iletimi, hücre siklus kontrolü, transkripsiyon regülasyonu, otofaji ve apoptozis gibi çeşitli yollarda görev alan geniş bir protein ailesidir. Sahip oldukları tekrar üniteleri sayesinde birden fazla proteinle etkileşime girerek çeşitli yollarda görev alabildikleri düşünülmektedir (Wang 2013). WD tekrar proteinleri, yapılan çalışmalarda hepatosellüler karsinom, tiroid karsinomu, akciğer ve özefagus karsinomunda up-regüle olarak bulunmuştur ve bu proteinlerin mevcut kanserler için tümör belirteci olabilecekleri vurgulanmıştır (Silva 2005, Akdi 2010, Sato 2010). Araştırmalarımıza göre bu protein ailesinin larenks kanserli vakalardaki değişimini inceleyen özgün bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Vakalarımızın tamamında WD repeat protein ailesinden olan **WDR66 (WD repeat domain 66)** proteinin ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır ve bu durum larenks kanser etiyolojisinde de bu protein ailesinin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Vakalarımızda ekspresyonu anlamlı derecede artan genlerden biri de **ACOT7** (acyl-CoA thioesterase 7)'dir. ACOT7, uzun zincirli yağ asitlerinin hidrolizinden sorumlu proteini kodlar. Temporal lobe epilepsisi ile ilişkili olduğu bilinen bu genin melanom vakalarında da ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Araştırmalarımıza göre literatürde larenks kanser vakaları üzerinde yapılan çalışma bulunmamaktadır ancak tüm vakalarımızdaki ekspresyon artışı larenks bölge tümörlerinde de ACOT7 geninin etkili olabileceğini göstermektedir.

Yukarıda bahsettiğimiz ve vakalarımızda ekspresyonu artan genlerden başka, tüm kanserli dokularda ekspresyonu anlamlı derecede azalan 2 gen mevcuttu. **CFD (complement factor D)** ve **ITM2A (integral membrane protein 2A)**.

**CFD (complement factor D)** geni, peptidazlardan olan tripsin ailesinin üyelerinden birini kodlar. Faktör D, vücudun infeksiyöz ajanlara karşı savunmasında önemli olan komplement sistem yolağında görev alarak anti-inflamatuar etki gösterir. Başlıca adipositler tarafından sentezlenen bu protein, monosit-makrofaj, astrosit ve hepatositler tarafından da sentezlenebilmektedir. Kitano E ve arkadaşları gastrik kanser hücre dizilerinde yaptıkları çalışmada CFD seviyesini artmış olarak saptamış ancak tüm kanser hücre dizi çeşitlerinde CFD miktar artışı, faktör D'nin gastrik epitel kaynaklı olabileceğini de düşündürmüştür (Kitano 2002). Ayrıca faktör D'nin yağ hücrelerine glukoz transportunu stimüle ettiğini ve lipolizi inhibe ederek adipositlerde trigliserid

birikimini sağladığını belirten yayınlar da mevcuttur. Bu durumun obeziteye sebep olabileceği de vurgulanmaktadır (Rosen 1989). Ye H ve arkadaşlarının dil skuamöz hücre karsinomlu 53 vaka ile yaptıkları çalışmada CFD gen ekspresyonu tümörlü dokularda istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmış olarak saptanmıştır (Ye 2008). Larenks kanser vakaları üzerinde yapılan özgün bir çalışma bulunmasa da baş-boyun tümörlerinden biri olan dil kanserlerinde saptanan bu durum, larenks kanser etiyojisinde de CFD down-regülasyonunun önemli olabileceğini düşündürmektedir.

**ITM2A (integral membrane protein 2A) geni**, osteojenik ve kondrojenik hücre farklılaşmasını sağlayan proteini kodlar (Deleersnijder1996). ITM2A ekspresyonu, kas, sinir ve yüz gelişimi için önemli bir transkripsiyon faktör olan PAX3 tarafından düzenlenir. ITM2A'nın ise hedefi GATA3 genidir. GATA3, T hücre bağımlı antijen cevabı ve timosit gelişimi için gereklidir. ITM2A'nın hücre içi fonksiyonu ve tümör oluşumundaki etkisi ise henüz bilinmemektedir. Ancak over kanserine sahip 90 vaka ile yapılan çalışmada, invaziv kanserlerin % 45.6'sında ITM2A'nın ekspresyonunun düşük bulunması nedeniyle tümör supresör etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Nguyen 2016). Vakalarımızın tamamında ITM2A gen ekspresyonunun anlamlı derecede azalmış olması, bu genin tümör supresör etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Tez çalışmamızda ekspresyonu değişen genlerin analizinin yanı sıra, etkilenen yolların analizi de mevcuttu. Tablo 5.3. ve 5.4.'de görüldüğü gibi tümörlü vakalarda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişime uğrayan birçok yolak saptanmıştır. Aktivasyonu artan yolların başında hücre siklus yolağı ve ekstrasellüler matriks yıkımı yolağı gelirken; elektron transport zincir yolağı da baskılanan yolların başında gelmektedir.

Hücre siklusu; hücre bölünmesi ve replikasyonunu kapsayan olaylar bütünüdür. Siklusun çeşitli aşamalarında kontrol noktaları vardır ve bu noktalar hücre proliferasyonunu düzenli olarak denetler. Proliferasyon ve apoptozisin denge halinde olduğu normal hücrelerin yanısıra; proliferasyonun artıp, apoptozisin azaldığı patolojik hücreler de mevcuttur ve bu hücrelerin başında kanser hücreleri gelmektedir. Hücre büyüme, çoğalma ve farklılaşmasında etkili olan proto-onkogenlerdeki değişimler hücre döngüsünü artırarak, tümör baskılayıcı etki gösteren genlerdeki değişimler ise siklus inhibisyon etkisini ortadan kaldırarak kansere neden olur (Vermeulen 2003). Vakalarımızın büyük çoğunluğunda hücre siklus yolağının etkilenmiş olması da, bu sürecin kanser oluşumunda ne kadar etkili olduğunu bir kez daha vurgulamaktadır.

Tümör gelişimi, bazı hücrel kompartımanlar arasındaki iletişim ve etkileşime dayanan kompleks bir sũreçtir. Solid tümörlerin çoğu ekstrasellũler matriksten zengin stromal yapıdadır ve tümörojenik sũreci dũzenleyen proteinler de ekstrasellũler matrikste mevcuttur (Campbell 2010). Tümör hũcrelerinin invazyon ve metastazı için bazal membran ve ekstrasellũler matriksin yıkılarak hũcrelerin diğer dokulara gũũ için ortam hazırlanması gerekmektedir. Bu sũreçteki en önemli enzimler matriks metalloproteinazlardır ve kollajenazlardır. Ekstrasellũler matriks yıkım yolağının birçok kanserde olduğu gibi larenks kanserlerinde de aktivitesinin artmış olması beklenmektedir ve vakalarımızın çoğunda saptadığımız yolak aktivasyonu literatũrũ desteklemektedir.

Mitokondri; hũcre enerji metabolizması, serbest radikal ¼retimi ve apoptozis gibi hũcre içi olaylarda önemli rol oynar. Mitokondrideki oksidatif fosforilasyonun çeşitli sebeplerle kesintiye uğraması ile ATP ihtiyacını karşılamak amaçlı glikolitik ATP ¼retim yolağı devreye girer. Kanser hũcreleri incelendiğinde, ATP ihtiyaçlarının b¼y¼k kısmını oksidatif fosforilasyon kaynaklı ATP yerine glikolitik kaynaklı ATP'den karşıladıkları gr¼lmektedir (Carew 2002). Mitokondrideki elektron transport yolağının kesintiye uğraması ile ortaya çıkan bir diğer durum ise ¼retilen serbest oksijen radikallerinin artması ve bu radikallerin hũcre stabilizasyonuna zarar vererek karsinojenik dn¼ř¼me zemin hazırlamasıdır (Liu 2002). Mitokondrinin apoptoz ¼zerindeki etkisine baktığımızda ise pro-apoptotik proteinlerden olan ve n¼kleer DNA tarafından ¼retilen sitokrom c, apoptozis uyarıcı faktör (AIF: apoptosis inducing factor), endon¼kleaz G ve smac/DIABLO'nun mitokondriye salındığı ve apoptotik sũreci başlattığı bilinmektedir (Wang 2001). Yukarıda bahsettiğimiz 3 mekanizmayı incelediğimizde; mitokondrideki elektron transport yolağının baskılanması ile kanser hũcrelerinin kullanımına daha uygun olan glikolitik ATP ¼retimi artmakta, hũcre stabilitesini bozan serbest oksijen radikal ¼retimi artmakta ve pro-apoptotik protein salınımının kesintiye uğraması ile de apoptozis baskılanmakta ve böylece kansere meyil oluşmaktadır. İncelediğimiz vakaların çoğunda elektron transport zincir yolağının etkilenmesi de bu durumu desteklemektedir.

Larenks skuamöz hũcreli karsinom etyolojisinde tümör s¼presr gen inaktivasyonu, protoonkogen aktivasyonu, invazyon kabiliyet artışı ve l¼ms¼zl¼k gibi molek¼ler olaylar suçlanmaktadır. Bu yolaklarda yer alan çeşitli genler tanımlanmış olsa da, olası yeni genlerin bulunması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. T¼m genom ekspresyon yöntemiyle larenks kanserli dokuda farklı eksprese olan t¼m genleri belirlemeyi amaçlayan tezimizin bu anlamda literatũre b¼y¼k katkı sağlayacağı d¼ř¼n¼lmektedir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm solid kanserlerde olduğu larenks kanserlerinde de tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ve/veya proto-onkogenlerin aktivasyonuna neden olan genom düzeyindeki değişimler kanser oluşumundan sorumludur. Genomda meydana gelen bu değişimlerin saptanması; erken tanı, kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin gelişimi ve prognoz tayini açısından oldukça önemlidir.

Larenks bölge tümörlerinin gelişiminde birçok genetik ve çevresel faktör suçlanmaktadır. Çevresel faktörlerin başında sigara ve alkol gelirken; genetik değişimlerin başında ise kromozom kayıp ya da kazançları, mutasyonlar ve gen ekspresyon değişimleri gelmektedir. Bu çalışmada larenks kanseri tanısı almış bireylerden normal ve kanseröz doku örnekleri alınarak, her iki dokuda ifade olan tüm gen seviyelerinin karşılaştırılması ve kanserli dokuda normal dokuya göre daha az ya da daha fazla eksprese olan genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirdiğimiz araştırmamızın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

- ❖ Bu çalışmada mikroarray yöntemi ile 12 larenks kanser olgusunun kanserli ve normal dokusunda, 47.323 prob kullanılarak tüm genom ekspresyon analizi yapıldı.
- ❖ Kanserli doku ve normal doku arasında ekspresyonu farklı olan 14.294 mRNA saptandı.
- ❖ Kanser dokusunda normal dokuya göre en az 2 katlık değişim anlamlı olarak kabul edildi (Fold Change >2).
- ❖ 2 kat ve üstü değişimler dikkate alındığında tüm vakaların kanserli dokusunda ekspresyonu artan 22 gen ve tüm vakalarda ekspresyonu azalan 2 gen saptandı.
- ❖ Ekspresyonu anlamlı derecede artan genlerden MMP1, MMP12, S100A2, S100A3, CK14, CK16, SLC2A1, ITGA6, CEP55, KLK6, LAMC2, IL1F9 ve TP63 daha önceki çalışmalarda larenks kanseri ile ilişkili bulunmuştur ve bulgularımız literatürü desteklemektedir.
- ❖ VSNL1, CXCL1, COL4A5, COL4A6, FSCN1, KRT6B, KRT17, WDR66 ve ACOT7 genlerinin de ekspresyonu anlamlı derecede artmıştır. Araştırmalarımıza göre mevcut genlerin larenks kanser olgularındaki değişimi hakkında yapılan çalışma bulunmamaktadır.

- ❖ Tüm vakalarda ekspresyonu anlamlı derecede azalan genler ise ITM2A ve CFD genleridir. Araştırmalarımıza göre; farklı kanser türlerinde her iki genin değişimi ile ilgili yayınlar olsa da larenks kanser olgularında mevcut genlerin ekspresyon değişimi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.
- ❖ Sonuç olarak, larenks kanser olgularından elde ettiğimiz kanseröz ve normal dokulardan, tüm genom ekspresyon mikroarray yöntemi ile larenks kanser etiolojisinde etkisi olduğu bilinen genlerin yanı sıra kanser oluşumunda etkisi olabileceğini düşündüğümüz yeni aday genler tespit ettik.

Larenks kanserinin moleküler temelini anlaşılmamasını hedefleyen araştırmamızın, larenks kanserinde belirteç olarak kullanılacak yeni genlerin saptanması, kanser erken tanısı, kişiselleştirilmiş tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve prognoz tayini açısından literatüre büyük katkı sağlayacağı ve daha sonra yapılacak spesifik gen çalışmalarımıza ışık tutacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abramson M, Schiling RW, Huang CC, Salome RG. Collagenase activity in epidermoid carcinoma of the oral cavity and larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1975 84:158–163.
- Agudelo D, Quer M, Leon X, Diez S, Burgues J. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. *Head Neck*. 1997 May;19(3):200-4.
- Akagi T, Hijiya N, Inomata M, Shiraishi N, Moriyama M, Kitano S. Visin in-like protein-1 overexpression is an indicator of lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2012 Sep 15;131(6):1307-17.
- Akdi A, Gimenez EM, Garcia-Quispes W, Pastor S, Castell J, Biarnes J et al. WDR3 gene haplotype is associated with thyroid cancer risk in a Spanish population. *Thyroid* 2010, 20:803–809.
- Allison LA, Çeviri editörü: Prof.Dr. Ali Osman Beldüz. Temel moleküler biyoloji. 2. Baskı. Palme yayıncılık, Ankara, 2014.
- Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Rigante M, Artuso A et al. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerisation phenomenon: a review. *Eur J Cancer*. 2004 Nov;40(16):2383-8.
- Almadori G, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Exarchakos G et al. Epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal cancer: an independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer*. 1999 Apr 20;84(2):188-91.
- Baba Y, Iyama K, Ikeda K, Ishikawa S, Hayashi N, Miyanari N et al. The expression of type IV collagen alpha6 chain is related to the prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008 Feb;15(2):555-65. Epub 2007 Oct 23.
- Batsakis JG, Luna MA, el-Naggar AK. Nonsquamous carcinomas of the larynx. *Ann Otol Rhinol* 1992;101(12): 1027-6.
- Bayani J, Diamandis EP. The physiology and pathobiology of human kallikrein-related peptidase 6 (KLK6). *Clin Chem Lab Med*. 2012;50:211–33.
- Bayer O, Cámara R, Zeissig SR, Rensing M, Dietz A, Locati LD et al. Occupation and cancer of the larynx: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Jan;273(1):9-20.
- Borgono CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:876–90.
- Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E et al. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer*. 2002 Aug 27;87(5):516-8.
- Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders J. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *Lancet Oncology*. 2008, 9(3):288-296.

- Campbell NE, Kellenberger L, Greenaway J, Moorehead RA, Linnerth-Petrik NM, Petrik J. Extracellular matrix proteins and tumorangiogenesis. *J Oncol.* 2010;2010:586905.
- Cardesa A, Slootweg PJ. *Pathology of the head and neck.* Berlin,Germany:Springer;2006.
- Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer.* 2002 Dec 9;1:9.
- Cazorla M, Hernandez L, Nadal A, Balbín M, López JM, Vizoso F et al. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol.* 1998 Oct;186(2):144-50.
- Chattopadhyay I, Singh A, Phukan R, Purkayastha J, Katakai A, Mahanta J et al. Genome-wide analysis of chromosomal alterations in patients with esophageal squamous cell carcinoma exposed to tobacco and betel quid from high-risk area in India. *Mutat Res.* 2010;696:130–138.
- Chen CH, Chien CY, Huang CC, Hwang CF, Chuang HC, Fang FM. Expression of FLJ10540 is Correlated with Aggressiveness of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma by Stimulating Cell Migration and Invasion through Increased FOXM1 and MMP-2 Activity. *Oncogene* 2009, 28, 2723-2737.
- Chen SF, Yang SF, Li JW, Nieh PC, Lin SY, Fu E et al. Expression of fascin in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas has prognostic significance - a tissue microarray study of 129 cases. *Histopathology* 2007, 51(2):173-183.
- Choi P, Chen C. Genetic expression profiles and biologic pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2005 Sep 15;104(6):1113-28.
- Cohen-Kerem R, Lahat N, Elmalah I, Greenberg E, Resnick MB, Doweck I et al. Detection of cytokeratins in normal and malignant laryngeal epithelia by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002 Feb;111(2):149-54.
- Coló AE, Simoes AC, Carvalho AL, Melo CM, Fahham L, Kowalski LP et al. Functional microarray analysis suggests repressed cell-cell signaling and cell survival-related modules inhibit progression of head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med Genomics.* 2011 Apr 13;4:33.
- Dagli S, Dagli U, Kurtaran H, Alkim C, Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol.* 2004 Jun;15(2):77-81.
- Deleersnijder W, Hong G, Cortvrindt R, Poirier C, Tylzanowski P, Pittois K et al. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins. *J Biol Chem* **271**Sep 1996 (32): 19475–82.
- Dolcetti R, Pelucchi R, Maestro S, Rizzo S, Pastore A, Boiocchi M. Proto-oncogene allelic variations in human squamous cell carcinomas of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1991;248(5):279-85.
- Dong Y, Sui L, Sugimoto K, Tai Y, Tokuda M. Cyclin D1-CDK4 complex, a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2001 Jul 20;95(4):209-15.

- Dong Y, Sui L, Tai Y, Sugimoto K, Hirao T, Tokuda M. Prognostic significance of cyclin E overexpression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000 6:4253–4258.
- Elci OA, Elci MA, Blair A, Dosemeci M. Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. *J Occup Environ Med* 2003; 45: 1100-6.
- Esteban F, Bravo JJ, González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Anticancer Res.* 2005 Mar-Apr;25(2A):1115-21.
- Farhadieh RD, Salardini A, Yang JL, Russell P, Smee R. Diagnosis of second head and neck tumors in primary laryngeal SCC is an indicator of overall survival and not associated with poorer overall survival: a single centre study in 987 patients. *J Surg Oncol* 2010;101(1):72-7.
- Field JK, Spandidos DA, Stell PM, Vaughan ED, Evan GI, Moore JP. Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 1989 4(12):1463-8.
- Franchi A, Gallo O, Sardi I, Santucci M. Downregulation of transforming growth factor beta type II receptor in laryngeal carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2001 54:201–204.
- Frederick L. Greene, *AJCC Cancer Staging Atlas 6th ed.* Chicago: Springer, 2006.
- Freije JM, Diez-Ita I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J et al. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinoma. *J Biol Chem.* 1994 269:16766–16773.
- Gao X, Fisher SG, Mohideen N, Emami B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56(2):427-35.
- Gemenetzidis E, Bose A, Riaz AM, Chaplin T, Young BD, Ali M. FOXM1 Upregulation is an Early Event in Human Squamous Cell Carcinoma and it is Enhanced by Nicotine during Malignant Transformation. *PLoS One* 2009;4(3):e4849.
- Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control.* 2002;9(5):369- 78.
- Globocan 2012, Estimate cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, International Agency for Research on Cancer.
- Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB et al. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J. Leukoc. Biol.* 2000 Jan 67 (1): 53–62.
- Hecht SS: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 733-744, 2003.
- Hsu YB, Chang SY, Lan MC, Huang JL, Tai SK, Chu PY. Second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the tongue and larynx: an analysis of incidence, pattern, and outcome. *J Chin Med Assoc* 2008;71(2):86-91.
- Hui L, Yang N, Yang H, Guo X, Jang X. Identification of biomarkers with a tumor stage-dependent expression and exploration of the mechanism involved in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2015 Nov;34(5):2627-35.

- Ikeda K, Iyama K, Ishikawa N, Egami H, Nakao M, Sado Y et al. Loss of expression of type IV collagen alpha5 and alpha6 chains in colorectal cancer associated with the hypermethylation of their promoter region. *Am J Pathol.* 2006 Mar;168(3):856-65.
- Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer.* 1996 Nov 4;68(3):325-32.
- Inoue T, Yashiro M, Nishimura S, Maeda K, Sawada T, Ogawa Y. Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gastric cancer. *Int J Mol Med* 1999;4:73-7.
- Irish JC, Bernstein A. Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 1993 Jan;103(1 Pt 1):42-52.
- Ito T, Ito M, Shiozawa J, Naito S, Kanematsu T, Sekine I. Expression of the MMP-1 in human pancreatic carcinoma: relationship with prognostic factor. *ModPathol* 1999;12:669-74.
- Jares P, Fernández PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G et al. PRAD-1/Cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54(17):4813-7.
- Jares P, Fernández PL, Nadal A, Cazorla M, Hernández L, Pinyol M et al. p16MTS1/CDK4I mutations and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene.* 1997 15:1445-1453.
- Jeannon JP, Soames JV, Aston V, Stafford FW, Wilson JA. Molecular markers in dysplasia of the larynx: expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p21, p27 and p53 tumour suppressor gene in predicting cancer risk. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004; 29: 698-704.
- Kaya S. *Larenks Hastalıkları*, Ed Çevik İ, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002, Ankara.
- Kerkelä E, Ala-Aho R, Jeskanen L, Rechartt O, Grénman R, Shapiro SD. Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumour cells in skin cancer. *J Invest Dermatol* 2000;114:1113-9.
- Krecicki T, Fraczek M, Jelen M, Podhorska M, Szkudlarek T, Zatonski T. Expression of collagenase-1 (MMP-1), collagenase-3 (MMP-13) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in laryngeal squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003 Oct;260(9):494-7. Epub 2003 May 9.
- Kirchner JA, Carter D. Pathology of the larynx . In: Sternberg's Diagnostic Surgical Patholog.Ed: Mills SE Volume 2. 4 th ed. Gopson Papers Ltd, Noida, India. 2004:1007-1032.
- Kitano E, Kitamura H. Synthesis of factor D by gastric cancer-derived cell lines. *Int Immunopharmacol.* 2002 May;2(6):843-8.
- Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997; 30: 1-19.
- Kuriakose MA, Chen WT, He ZM, Sikora AG, Zhang P, Zhang ZY et al. Selection and validation of differentially expressed genes in head and neck cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Jun;61(11):1372-83.

- Lazaris AC, Lendari I, Kavantzias N, Kandiloros D, Adamopoulos G, Davaris P. Correlation of tumor markers p53, bcl-2 and cathepsin-D with clinicopathologic features and disease-free survival in laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 2000;50(9):717-24.
- Lauriola L, Michetti F, Maggiano N, Galli J, Cadoni G, Schafer BW et al. Prognostic significance of the Ca(2+) binding protein S100A2 in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2000 89:345–349.
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: Overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000 May;113 (Pt 10): 1661–1670.
- Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Remacle M. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in supraglottic carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol. Belg.*, 51: 129–135, 1997.
- Liu W, Xiang C, Jia S. Study on the expression of matrix metalloproteinase-12 and NM\_002426 in squamous laryngeal carcinoma. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 2006 Dec;20(24):1120-3.
- Li Y, Wang P, Xie Z, Huang L, Yang R, Gao L et al. Whole Genome Expression Profiling and Signal Pathway Screening of MSCs in Ankylosing Spondylitis. 2014;2014:913050. Epub 2014 Dec 3.
- Liu SL, Lin X, Shi DY, Cheng J, Wu CQ, Zhang YD. Reactive oxygen species stimulated human hepatoma cell proliferation via cross-talk between PI3-K/PKB and JNK signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* 2002, 406:173-182.
- Luo XM, Zhou SH, Fan J. Glucose transporter-1 as a new therapeutic target in laryngeal carcinoma. *J Int Med Res*. 2010;38(6):1885-92.
- Lüleyap HÜ. Moleküler genetiğin esasları. Adana: Nobel kitabevi; 2008.
- Ma LJ, Li W, Zhang X, Huang DH, Zhang H, Xiao JY et al. Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Arch Med Res*. 2009 Feb;40(2):114-23.
- Magary SP, Ryan MW, Tarnuzzer RW, Kornberg L. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: a quantitative analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122: 712-6.
- Mahloogi H, Gonzalez-Guerrico AM, Lopez De Cicco R, Bassi DE, Goodrow T, Braunewell KH et al. Overexpression of the calcium sensor visinin-like protein-1 leads to a cAMP mediated decrease of in vivo and in vitro growth and invasiveness of squamous cell carcinoma cells. *Cancer Res* 2003;63:4997–5004.
- Mastronikolis NS, Papadas TA, Goumas PD, Triantaphyllidou IE, Theocharis DA, Papageorgakopoulou N et al. Head and neck: Laryngeal tumors: an overview. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2009; 13(11):888-893.
- Mastronikolis NS, Papadas TA, Goumas PD, Triantaphyllidou IE, Theocharis DA, Papageorgakopoulou N, Vynios DH. Head and neck: Laryngeal tumors: an overview, Published in Atlas Database: December 2008.
- Meller SM. Functional anatomy of the larynx. *Clin North Am* 1984;178(1): 3-12.

- Mendenhall WM, Werning JW, Hinerman RW, Amdur RJ, Villaret DB. Management of T1-T2 glottic carcinomas. *Cancer* 2004;100(9):1786-92.
- Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Bugel I, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *Eur J Cancer Prev*. 2004 Jun;13(3):165-72.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*. 1999 Apr 22;398(6729):708-13.
- Moore CE, Wiatrak BJ, McClatchey KD, Koopmann CF, Thomas GR, Bradford CR et al. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999 May;120(5):698-705.
- Murray I, Duncan ME, O'Neil P, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med* 1996;2:461-2.
- Münger K, Baldwin A, Edwards EM, Hayakawa H. Mechanisms of human papilloma virus induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-60.
- Nadal A, Cardesa A. Molecular biology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2003; 442(1):1-7.
- Nadal A, Jares P, Cazorla M, Fernández PL, Sanjuan X et al. p21WAF1/Cip1 expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol*. 1997 183:156-163.
- National Human Genome Research Institute , <https://www.genome.gov/>, 13.03.2016.
- Nguyen TM, Shin IW, Lee TJ, Park J, Kim JH, Park MS et al. Loss of ITM2A, a novel tumor suppressor of ovarian cancer through G2/M cell cycle arrest, is a poor prognostic factor of epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016 Mar;140(3):545-53.
- Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kähäri VM, Pyrhönen S. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2002;97:432-8.
- O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2002 Oct;38(7):627-40.
- Ozcan O. Solunum sistemi. In: Moore KM, Persaud TVN (Eds). *İnsan Embriyolojisi, Klinik Yonleri İle*. Turkiye ceviri. 1th ed. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002: 259-260.
- Parkin DM, Boyd L, Walker LC. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. Summary and conclusions. *Br J Cancer* 2011;105 (S2):S77-S81.
- Peschos D, Tsanou E, Stefanou D, Damala C, Vougiouklakis T, Mitselou A et al. Expression of cyclin-dependent kinases inhibitors p21(WAF1) and p27(KIP1) in benign, premalignant and malignant laryngeal lesions. correlation with cell cycle regulatory proteins. *In Vivo*. 2004 Nov-Dec;18(6):719-24.
- Pietruszewska W, Klatka J, Borzecki A, Rieske P. Loss of heterozygosity for Rb locus and pRb immunostaining in laryngeal cancer: a clinicopathologic, molecular and immunohistochemical study. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(4):479-85.

- Pruneri G, Pignataro L, Manzotti M, Carboni N, Ronchetti D, Neri A et al. P63 in laryngealsquamous cell carcinoma: evidence for a role of TA-p63 down-regulation in tumorigenesis and lack of prognostic implications of p63 immunoreactivity. *Lab Invest.* 2002 Oct;82(10):1327-34.
- Rafferty M, Walker C, Husband D, Helliwell T, Fenton J, Jones A Retinoblastoma gene abnormalities in early laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008 Jul;265 Suppl 1:S83-7.
- Ramroth H, Ahrens W, Dietz A, Becher H. Occupational asbestos exposure as a risk factor for laryngeal carcinoma in a population-based case-control study from Germany. *Am J Ind Med* 2011;54(7):510–514. doi:10.1002/ajim.20963.
- Riboli E, Kaaks R, Esteve J. Nutrition and laryngeal cancer. *Cancer Causes & Control:CCC.* 1996;7(1):147-56.
- Rosai J. Larynx and trachea. In: Rosai J, editor. *Ackerman's surgical pathology.* St. Louis: Mosby; 1996. p. 314-32.
- Rosai J. Respiratory tract. In: Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology.* Volume 1. 9 th ed. Elsevier, China, 2004: 335-359.
- Rosen BS, Cook KS, Yaglom J, Groves DL, Volanakis JE, Damm D et al. Adipsin and complement factor D activity: an immune-related defect in obesity. *Science.* 1989 Jun 23;244(4911):1483-7.
- Rottman JB. The ribonuclease protection assay: a powerful tool for the veterinary pathologist. *Vet Pathol.* 2002 Jan;39(1):2-9.
- Ruokolainen H, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Expression of matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin Cancer Res.* 2004 May 1;10(9):3110-6.
- Sarac S, Ayhan A, Hosal AS, and Kaya S. Prognostic significance of PCNA expression in laryngeal cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.,* 124: 1321–1324, 1998.
- Sato N, Koinuma J, Fujita M, Hosokawa M, Ito T, Tsuchiya E. Activation of WD repeat and high-mobility group box DNA binding protein 1 in pulmonary and esophageal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2010, 16:226–239.
- Schrader CH, Kolb M, Zaoui K, Flechtenmacher C, Grabe N, Weber KJ. Kallikrein-related peptidase 6 regulates epithelial-to-mesenchymal transition and serves as prognostic biomarker for head and neck squamous cell carcinoma patients. *Mol Cancer.* 2015 May 20;14:107.
- Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN, Touboul E, De Vataire F, Andolenko P, et al. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. *Cancer* 1994;74(7):1933-8.
- Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993;268:23824–9.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2015.* *CA Cancer J Clin.* 2015 Jan-Feb;65(1):5-29.

- Silva FP, Hamamoto R, Nakamura Y, Furukawa Y: WDRPUH, a novel WDrepeat-containing protein, is highly expressed in human hepatocellular carcinoma and involved in cell proliferation. *Neoplasia* 2005, 7:348–355.
- Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofty S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 2001;111(6):1079-87.
- Speicher MR, Howe C, Crotty P, du Manoir S, Costa J, Ward DC. Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 1995 55:1010–1013.
- Starska K, Forma E, Józwiak P, Bryś M, Lewy-Trenda I, Brzezińska-Błaszczyk et al. Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-the relationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression, tumor invasiveness, and patient prognosis. *Tumour Biol.* 2015 Apr;36(4):2309-21.
- Sumantran VN, Mishra P, Sudhakar N. Microarray analysis of differentially expressed genes regulating lipid metabolism during melanoma progression. *Indian J Biochem Biophys.* 2015 Apr;52(2):125-31.
- Şimşek H, Han Ü, Önal B, Şimşek G. The expression of EGFR, cerbB2, p16, and p53 and their relationship with conventional parameters in squamous cell carcinoma of the larynx, *Turk J Med Sci*, 2014.
- Şimşek Ö. Mikroarray Teknolojisi ve Diş Hekimliği'nde Kullanımı. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. Supplement: 7*, Yıl: 2013, Sayfa : 55-62.
- Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer CausesControl* 2002;13(10):957–964.
- Tripathi SC, Matta A, Kaur J, Grigull J, Chauhan SS, Thakar A et al. Nuclear S100A7 is associated with poor prognosis in head and neck cancer. *PLoS One.* 2010;5:e11939.
- To-Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Pique E, Borrego N, Caballero M, et al. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer Lett.* 2002 Dec 10;187(1-2):95-101.
- Tyszkiewicz T, Jarzab M, Szymczyk C, Kowal M, Krajewska J, Jaworska M et al. Epidermal differentiation complex (locus1q21) gene expression in head and neck cancer and normal mucosa. *Folia Histochem Cytobiol.* 2014;52(2):79-89.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309:418–25.
- Uzun L, Beder LB. Baş-Boyun Kanserlerinde Gen Tedavisi Uygulamaları. *KBB-Forum* 2004;3(3).
- Xie Y, Chan H, Fan J, Chen Y, Young J, Li W et al. Involvement of visinin-like protein-1 (VSNL-1) in regulating proliferative and invasive properties of neuroblastoma. *Carcinogenesis* 2007;28: 2122–30.

- van der Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, Ramaekers FCS, Kuijpers W. Cytokeratin expression in normal and (pre)malignant head and neck epithelia: an overview. *Head Neck* 1993; 15:133-46.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cellcycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-49.
- Vihinen P, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer.* 2002 May 10;99(2):157-66.
- Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA et al. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope.* 2000 Mar;110(3 Pt 1):374-81.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001, 15:2922-2933.
- Wang Q, Ma C, Kemmner W. Wdr66 is a novel marker for risk stratification and involved in epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Mar 21;13:137.
- Web 1: [http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/105\\_tibbi/1.pdf](http://dent.ege.edu.tr/dosyalar/kaynak/105_tibbi/1.pdf), 20.02.2016
- Web 2: [http://preuniversity.grkraj.org/html/10\\_MOLECULAR\\_BIOLOGY.htm](http://preuniversity.grkraj.org/html/10_MOLECULAR_BIOLOGY.htm)
- Web 3: [http://preuniversity.grkraj.org/html/10\\_MOLECULAR\\_BIOLOGY.htm](http://preuniversity.grkraj.org/html/10_MOLECULAR_BIOLOGY.htm)
- Web4:[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a5/Ribosome\\_mRNA\\_translation\\_tr.svg/2000px-Ribosome\\_mRNA\\_translation\\_tr.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a5/Ribosome_mRNA_translation_tr.svg/2000px-Ribosome_mRNA_translation_tr.svg.png)
- Web 5: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Northern\\_Blot\\_Scheme.PNG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Northern_Blot_Scheme.PNG)
- Web 6: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3918>
- Web 7: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ITGA6#resources>, 08.06.2016
- Web 8: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRT17#resources>, 07.06.2016
- Web 9: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000128422-KRT17/cancer>, 07.06.2016.
- Web 10: <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000185479-KRT6B/cancer>, 07.06.2016.
- Wei Q, Sheng L, Shui Y, Hu Q, Nordgren H, Carlsson J. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1193-1201.
- Williams, H.K.: Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* 53: 165-172, 2000.
- Wolff HA, Rolke D, Rave-Fränk M, Schirmer M, Eicheler W, Doerfler A et al. Analysis of chemokine and chemokine receptorexpression in squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell lines. *Radiat Environ Biophys.* 2011 Mar;50(1):145-54.
- Wunsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *Sao Paulomedical journal: Revista paulista de medicina.* 2004;122(5):188-94.
- Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the

- International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium(link is external). *Am J Epidemiol* 2013;178(5):679-90.
- Yamashita K, Mori M, Kataoka A, Inoue H, Sugimachi K. The clinical significance of MMP-1 expression in esophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2001;84: 276–82.
- Yan SX, Luo XM, Zhou SH, Bao YY, Fan J, Lu ZJ, et al. Effect of antisense oligodeoxynucleotides glucose transporter-1 on enhancement of radiosensitivity of laryngeal carcinoma. *Int J Med Sci.* 2013;10:1375–86.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 1999 398:714– 718.
- Yang B, Bao X. Identification of genes associated with laryngeal squamous cell carcinoma samples based on bioinformatic analysis. *Mol Med Rep.* 2015 Sep;12(3):3386-92.
- Yarbrough WG, Shores C, Witsell DL, Weissler MC, Fidler ME, Gilmer TM. Ras mutations and expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Laryngoscope.* 1994 104:1337–1347.
- Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics.* 2008 Feb 6;9:69.
- Yoo GH, Xu HJ, Brennan JA, Westra W, Hruban RH, Koch W et al. Infrequent inactivation of the retinoblastoma gene despite frequent loss of chromosome 13q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54(17):4603-6.
- Zhang FR, Tao LH, Shen ZY, Lv Z, Xu LY, Li EM. Fascin expression in human embryonic, fetal, and normal adult tissue. *J Histochem Cytochem* 2008, 56(2): 193-199.
- Zhou S, Wang S, Wu Q, Fan J, Wang Q. Expression of glucose transporter-1 and -3 in the head and neck carcinoma – the correlation of the expression with the biological behaviors. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2008; 70: 189 – 194.

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA İÇİN AYDINLATILMIŞ HASTA ONAM FORMU**  
**LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!**

Klinik bir çalışmaya dahil edildiniz. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini tam olarak anlamanız ve kararınızı, araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra özgürce vermeniz gerekmektedir. Araştırma ile ilgili olarak belirtildiği halde anlayamadığınız ya da belirtilemediğini fark ettiğiniz noktalar olursa hekiminize sorunuz ve sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım **gönüllülük** esasına dayalıdır. Araştırma hakkında tam olarak bilgilendirildikten sonra, kararınızı özgürce verebilirsiniz ve düşünmeniz için formu imzalamadan önce hekiminiz size zaman tanıyacaktır. Kararınız ne olursa olsun, hekimleriniz sizin tam sağlık halinizin sağlanmasına ve korunmasına yönelik görevlerini bundan sonra da eksiksiz yapacaklardır. Araştırmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde formu imzalayınız.

**ARAŞTIRMANIN ADI**

Larenks kanserlerinde tüm genom ekspresyon farklılığının belirlenmesi

**ARAŞTIRMANIN AMACI**

Larenks kanserli vakalarda kanseröz dokuda normal dokuya göre daha az ya da daha fazla eksprese olan genlerin belirlenmesi

**KULLANILAN YÖNTEM**

Larenks kanser tanısı alarak cerrahi tedaviye karar verilen hastalardan operasyon sırasında rutinde alınan patolojik doku ve normal doku örneklerinden numuneler alınacak. Alınan numuneler sonrasında RNA elde edilmesi amacıyla RNALater solüsyonu içerisinde kriyotüplerde saklanacaktır.

**KULLANILACAK OLAN MATERYAL**

Ameliyet esnasında rutinde alınan patolojik doku ve normal doku örneği

**BİLGİLENDİRME**

Hastayı etkileyeceği düşünülen bir sonuca ulaşırsa hasta bilgilendirilecektir.

Araştırma ile ilgili olarak yeterince bilgilendirildim. Çalışmaya gönüllü olarak katılacağım.

**TARİH :**

**İMZALAR:**

Gönüllü ad soyad:

Araştırmacı ad soyad: Arş.Gör.Dr.Emine GÖKTAŞ

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:09

Toplantı Tarihi: 13.03.2015

**Karar Sayısı:2015/146;**Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM' ın "LARENKS KANSERLERİNDE TÜM GENOM EKSPRESYON FARKLILIĞININ BELİRLENMESİ VE KLİNİK ÖNEMİ" başlıklı uzmanlık tez çalışması ile ilgili 26.02.2015 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Arş. Gör. Dr. Emine GÖKTAŞ' ın uzmanlık tez çalışmasının Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç Ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. M. Selman YILDIRIM

Yardımcı Araştırmacılar: Arş. Gör. Dr. Emine GÖKTAŞ, Prof. Dr. Kayhan ÖZTÜRK

ASLI GİBİDİR  
13.03.2015

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU  
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı