

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPOKSİ VE EMBRİYONİK KÖK HÜCRE GENLERİNİN LARİNKS KANSERİ PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ

Nermin Seda ILGAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

ADANA -2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HİPOKSİ VE EMBRİYONİK KÖK HÜCRE GENLERİNİN LARİNKS KANSERİ PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ

Nermin Seda ILGAZ

**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

Bu tez, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) tarafından desteklenmiştir.

Tez No:.....
ADANA -2017

KABUL ONAY

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı doktora programı çerçevesinde yürütölmüş olan
"HİPOKSİ VE EMBRİYONİK KÖK HÜCRE GENLERİNİN LARİNKS KANSERİ
PATOGENEZİNDEKİ ROLÜ" adlı çalışma aşğıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07 / 09 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi

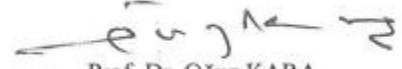
Başkan



Prof. Dr. Ümit LÜLEYAP

Çukurova Üniversitesi

Üye



Prof. Dr. Oğuz KARA

Çukurova Üniversitesi

Üye



Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ

Harran Üniversitesi

Üye



Yrd. Doç. Dr. Ertan AY

Mersin Üniversitesi

Üye

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. / / 20....

İMZA

Adı Soyadı

Kayıtlı olunan Program : Tıbbi Biyoloji Doktora
Tezin Konusu : Hipoksi ve Embriyonik Kök Hücre Genlerinin Larinks Kanseri Patogeneziindeki Rolü

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Davut ALPTEKİN

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon : 05325881685

E-Posta : alptekin@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon : 05336347711

E-Posta : seda8407@yahoo.com

Adresi : Çukurova Üniversitesi Tıp
Fakültesi Tıbbi Biyoloji
A.D

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisi, tecrübesi ve sabrı ile her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN' e,

Doktora eğitimim süresince değerli katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. H. Ümit LÜLEYAP ve bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Halil KASAP, Prof. Dr. Mülkiye KASAP, Prof. Dr. Osman DEMİRHAN, Prof. Dr. AYFER PAZARBAŞI ve Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ 'a,

Çalışmamız için gereken dokuların temin edilmesinde yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Özgür SÜRMEİİÖĞLU' na,

Tez çalışmam sırasında yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan dostlarım Arş. Gör. Lütüye ÖZPAK, Arş. Gör. Gamze CÖMERTPAY, Uzm. Bio. Nurşen KESER, Bio. Hale ÖKSÜZ ve bölümdeki çalışma arkadaşlarıma,

Bölümümüzün tüm çalışanlarına,

Güven ve sevgileri ile beni her zaman destekleyen, sevgili annem, babam ve kardeşime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Larinks Anatomisi	3
2.2. Larinks Embriyolojisi	4
2.3. Larinks Histolojisi	5
2.4. Larinks Fizyolojisi	5
2.4.1. Sfinkter (koruma) Fonksiyonu:	5
2.4.2. Solunum Fonksiyonu:	5
2.4.3. Konuşma Fonksiyonu:	6
2.5. Larinks Kanserleri	6
2.5.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	6
2.5.2. Etyoloji	7
2.5.3. Patoloji	9
2.5.4. Tanı	10
2.5.5. Evreleme	11
2.5.6. Metastaz	14
2.5.7. Tedavi	14
2.6. Kanser Oluşumu	14
2.7. Hipoksi ve Kanser	16
2.7.1. Hipoksinin İndüklediği Faktörler	21
2.8. Kök Hücreler	23

2.8.1. Embriyonik Kök Hücre Çekirdek Transkripsiyon Faktörleri	24
2.8.2. SOX2.....	27
2.8.3. NANOG	30
2.8.4. OCT4.....	33
2.9. CD133	36
2.10. ESRRA.....	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1. Gereç	41
3.1.1. Örneklerin Eldesi	41
3.1.2. Hep-2 Hücrelerin Temini	41
3.1.3. FaDu Hücrelerinin Temini	41
3.1.4. Gereç ve Cihazlar	41
3.1.4.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	41
3.1.4.2. Gerekli solüsyonlar ve malzemeler	42
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Hep-2 Hücre Kültürü.....	43
3.2.2. FaDu Hücre Kültürü.....	44
3.2.3. Hücre Çözülmesi ve Pasajlanması	45
3.2.4. Hipoksi Muamelesi	45
3.2.5. XCT790 muamelesi	46
3.2.6. Dokudan RNA İzolasyonu	46
3.2.7. Hücre Serisinden RNA İzolasyonu	47
3.2.8. RNA Kantitasyonu	47
3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	47
3.2.10. Real Time PCR	48
3.2.11. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Hasta Bilgileri	51
4.2. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA Genlerinin Ekspresyon Değerlendirilmesi.....	56

4.2.1. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında HIF-1 α ve HIF-2 α Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	56
4.2.2. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında SOX2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	58
4.2.3. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında OCT4 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	59
4.2.4. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında NANOG Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	60
4.2.5. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında CD133 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	61
4.2.6. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında ESRRA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	62
4.2.7. Tümörlü Dokularda Genler arasındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi ..	63
4.2.8. Gen ekspresyonlarının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi	63
4.3. Hipoksi Muamelesi	67
4.3.1. Hep-2 Hücreleri Hipoksi Muamelesi	68
4.3.2. FaDu Hücreleri Hipoksi Muamelesi	72
4.3.3. HEP2 Hücreleri XCT790 Muamelesi	76
4.3.4. FaDu Hücreleri XCT790 Muamelesi	77
5. TARTIŞMA.....	78
5.1. Hipoksi Muamelesi	78
5.2. HIF-1 α ve HIF-2 α	79
5.3. SOX2.....	81
5.4. OCT4.....	86
5.5. NANOG	90
5.6. CD133	93
5.7. ESRRA.....	94
5.8. Tümörlü Dokularda Genler Arasındaki Korelasyon	95
5.9. Hipoksi- Embryonik Kök Hücre Belirteçleri	97
5.10. XCT-790 Uygulaması	98
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	101
KAYNAKLAR	103

EKLER	114
EK 1. Etik Kurul Kararı.....	114
ÖZGEÇMİŞ	115



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Larinks Anatomisi	4
Şekil 2.2. Hipoksinin kanser gelişimindeki rolü	17
Şekil 2.3. HIF-1 α geninin yapısı	21
Şekil 2.4. HIF-2 α geninin yapısı	21
Şekil 2.5. HIF çalışma mekanizması-1	22
Şekil 2.6. HIF çalışma mekanizması-2	23
Şekil 2.7. Embriyonik kök hücre ve kanser hücrelerinin kullandığı ortak genler.	26
Şekil 2.8. Çekirdek Transkripsiyon faktörleri	27
Şekil 2.9. SOX2 geninin yapısı	28
Şekil 2.10. SOX2 geninin kanserdeki rolü	30
Şekil 2.11. NANOG geninin yapısı	31
Şekil 2.12. NANOG geninin kanser sinyal yollarındaki rolü	33
Şekil 2.13. OCT4 geninin yapısı	34
Şekil 2.14. OCT4 geninin kanserde düzenlenmesi ve rolü.	36
Şekil 2.15. ESRRA geninin yapısı	38
Şekil 3.1. Hep-2 hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü ($\times 40$)	44
Şekil 3.2. FaDu hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü ($\times 10$)	44
Şekil 4.1. Hipoksi Muamelesi	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 2.1.	TNM evreleme sistemi12
Çizelge 2.2.	Çeşitli dokuların fizyolojik ve hipoksik koşullardaki O ₂ miktarı.20
Çizelge 3.1.	Ekipman ve Sarf Malzemeler42
Çizelge 3.2.	RT Master Mix Hazırlama.....48
Çizelge 3.3.	cDNA sentezi protokolü48
Çizelge 3.4.	Real Time RT- PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları49
Çizelge 3.5.	Applied Biosystems 7500 real -time RT-PCR için kullanılan Program49
Çizelge 4.1.	Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi K.B.B Anabilim Dalı'nda opere edilen larinks kanserli tümör örneklerine ait bilgiler.....52
Çizelge 4.2.	26 skuamöz hücreli larinks kanseri hastasına ait klinik ve patolojik özellikler.54
Çizelge 4.3.	Hastaların tümör ve normal dokusundan elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve safılık değerleri55
Çizelge 4.4.	26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında HIF-1 α gen ekspresyonu56
Çizelge 4.5.	26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında HIF-2 α gen ekspresyonu57
Çizelge 4.6.	26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında SOX2 gen ekspresyonu.....58
Çizelge 4.7.	26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında OCT4 gen ekspresyonu59
Çizelge 4.8.	26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında NANOG gen ekspresyonu60
Çizelge 4.9.	26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında CD133 gen ekspresyonu61
Çizelge 4.10.	26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında ESRRA gen ekspresyonu62
Çizelge 4.11.	Hep-2 hücrelerinde HIF-1 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....68
Çizelge 4.12.	Hep-2 hücrelerinde HIF-2 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....68
Çizelge 4.13.	Hep-2 hücrelerinde SOX2 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....69
Çizelge 4.14.	Hep-2 hücrelerinde OCT4 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....69
Çizelge 4.15.	Hep-2 hücrelerinde NANOG mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....70
Çizelge 4.16.	Hep-2 hücrelerinde CD133 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....70
Çizelge 4.17.	Hep-2 hücrelerinde ESRRA mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....71

Çizelge 4.18.	FaDu hücrelerinde HIF-1 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	72
Çizelge 4.19.	FaDu hücrelerinde HIF-2 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	72
Çizelge 4.20.	FaDu hücrelerinde SOX2 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	73
Çizelge 4.21.	FaDu hücrelerinde OCT4 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	73
Çizelge 4.22.	FaDu hücrelerinde NANOG mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	74
Çizelge 4.23.	FaDu hücrelerinde CD133 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	74
Çizelge 4.24.	FaDu hücrelerinde ESRRA mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.....	75
Çizelge 4.25.	XCT790 muamelesi öncesi Hep-2 hücrelerinde hipoksinin neden olduğu gen ekspresyon değişim çizgesi.....	76
Çizelge 4.26.	Farklı dozlarda XCT790 uygulaması sonucu gen ekspresyonlarındaki değişim.	76
Çizelge 4.27.	XCT790 muamelesi öncesi FaDu hücrelerinde hipoksinin neden olduğu gen ekspresyon değişimi.	77
Çizelge 4.28.	Farklı dozlarda XCT790 uygulaması sonucu gen ekspresyonlarındaki değişim.	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μM	: mikromolar
AJCC	: American Joint Committee on Cancer
ALDH1	: Aldehit dehidrojenaz-1
cDNA	: Komplementer DNA
DBD	: DNA bağlanma domaini
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitelyal mezenşimal transisyon
ER	: Östrojen reseptör
ERRE	: Estrojen related response elemanlar
ESRRA	: Estrogen related receptor alpha
HIF	: Hipoksinin indüklediği faktör
HIF-1α	: Hipoksinin indüklediği faktör1α
HIF-2α	: Hipoksinin indüklediği faktör 2α
HMG	: High-mobility group
HPV	: Human papilomavirus
HRE	: Hypoxia response element
IPS	: Induced pluripotent stem cells
LBD	: Ligand bağlanma domaini
LDH	: Laktat dehidrojenaz
LEF1	: Lenfoid Enhancer Faktör1
M	: Uzak metastaz
miRNA	: mikro RNA
N	: Bölgesel lenf nodu tutulumu
NR	: Nüklear reseptörler
NTD	: N-terminal domain
OCT-4	: Octomer-binding transkripsiyon faktörü 4
ONR	: Orphan nüklear reseptörler
OPN	: Osteopontin
PDH	: Prüvat dehidrojenaz
PDK	: Prüvat dehidrojenaz kinaz

SEER	: Surveillance, Epidemiology, and End Results
SOX2	: Sry-related HMG box 2
SUMO	: Küçük ubikuitin ilişkili modifiye edici
T	: Primer tümör
TNM	: Tümör-nod-metastaz
UICC	: The International Union for Cancer Control
WNT11	: Wingless-type MMTV integration site family member 11



ÖZET

Hipoksi Ve Embriyonik Kök Hücre Genlerinin Larinks Kanseri Patogenezindeki Rolü

Larinks kanseri, baş boyun kanserlerinin ortalama %25'ini oluşturmakta ve genellikle orta yaş ya da ileri yaş erkeklerde görülmektedir. Larinks kanserlerinin %90'dan fazlası yassı hücre kanserleridir. Solid tümörler bilinen tüm kanserlerin %90'ını oluşturmaktadır. Solid tümörlerin en yaygın özelliği ve önemli çevresel streslerden biri hipoksidir. Oksijen konsantrasyonunun fizyolojik seviyenin altına düşmesi, in vitroda insan embriyonik kök hücrelerinin devamlılığını, spontan farklılaşmanın azalmasını sağlamakta, kendini yenilemeyi desteklemektedir. Kök hücre ve kanser hücreleri arasındaki benzerlikler her iki grubun gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ortak yollar olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamıza Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda skuamöz hücreli larinks kanser teşhisi almış 26 hasta dahil edildi. Dokulardan RNA izolasyonu yapılarak tümör ve normal dokularda hipoksinin indüklediği faktörler ve embriyonik kök hücre genlerinin ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Çalışmamızda tümör dokularında HIF-1 α , OCT4 ve NANOG genlerinin ekspresyonunun normal dokuyla karşılaştırıldığında arttığı saptandı. Ayrıca Hep2 larinks kanseri ve FaDu farenks kanseri hücre serileri hipoksiye maruz bırakılarak, hipoksinin, HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA genleri üzerindeki etkisi belirlendi. Çalışmamızda hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133 ve ESRRA genlerinin mRNA ekspresyonlarında artış gözlenirken, FaDu hücrelerinde HIF-1 α ve SOX2 mRNA ekspresyonunda azalma, HIF-2 α , OCT4, NANOG, CD133 ve ESRRA mRNA ekspresyonlarında artma gözlenmiştir. Hücreler ESRRA inhibitörü XCT790 ile muamele edildiğinde, hücrelerde hipoksinin indüklediği gen ekspresyon profilinin değiştiği saptanmıştır. Bu çalışma sonunda larinks kanseri tedavisinde hipoksinin etkisini azaltılmasında yeni stratejiler geliştirilmesine yönelik bir yaklaşım sunulmuş oldu.

Anahtar kelimeler: Larinks kanseri, hipoksi, embriyonik kök hücre genleri, Real Time-PCR

ABSTRACT

The Role Of Hypoxia And Embryonic Stem Cell Genes In Laryngeal Cancer Pathogenesis

Laryngeal cancer accounts for about 25% of head and neck cancers and is usually seen in men of middle or older age. More than 90% of laryngeal cancers are squamous-cell cancers. One of the most common features of solid tumors and one of the major environmental stresses is hypoxia. The reduction of the oxygen concentration below the physiological level, promotes maintenance and self-renewal of the human embryonic stem cells, and reducing spontaneous differentiation in vitro. Similarities between stem cell and cancer cells suggest that both groups may use common pathways in the regulation of gene expression.

Twenty six patients with squamous cell laryngeal carcinoma who were diagnosed at University of Cukurova Medical School, Department of Otolaryngology were included in this study. RNA isolation from tissues was performed to compare the expression levels of hypoxia inducible factors and embryonic stem cell genes in tumor and normal tissues. In our study, it was determined that the expression of HIF-1 α , OCT4 and NANOG genes were increased in tumor tissues compared to normal tissues. Furthermore, for determining the effect of hypoxia on HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA genes, Hep2 larynx cancer and FaDu pharynx cancer cell lines were exposed to hypoxia. In our study, mRNA expressions of HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133 and ESRRA genes were elevated in hypoxia-exposed Hep-2 cells, in hypoxia exposed FaDu cells, mRNA expression of HIF-1 α and SOX2 were decreased, HIF-2 α , OCT4, NANOG, CD133 and ESRRA mRNA expressions were increased. When cells were treated with the ESRRA inhibitor XCT790, hypoxia-induced gene expression profiles were changed. Our study provides a new approach to develop new strategies in reducing the effect of hypoxia in the treatment of larynx cancer.

Key Words: Larynx cancer, hypoxia, embryonic stem cell genes, Real Time-PCR

1. GİRİŞ

Kanser, genetik ve epigenetik değişiklikler ile oluşan ve sonuçta gen ekspresyon profillerinin dzeninin değişmesi ve moleküler ağların bozulması ile sonuçlanan bir hastalıktır^{1,2}. Baş-boyun kanserleri, oral kavte, farinks, larinks, paranzal sinusler ve nazal kavitenin epitelyal malignitelerini tanımlamaktadır. Baş-boyun kanserleri, tüm kanserlerin %6'sını oluşturmakta, kanserden ölümlerin ise %5'ine neden olmakta ve sıklığa göre tüm kanserler arasında 6. sırada yer almaktadır^{3,4,5}.

Boyunda, 3-6 servikal vertebralar arasında bulunan, konuşma, solunum ve koruma gibi temel fonksiyonları olan larinks, supraglottik, glottik, subglottik olarak üç kısımdan oluşmaktadır^{6,7}.

Larinks kanseri dünya genelinde yeni tespit edilen malignitelerin yaklaşık % 2.4'n oluşturmaktadır. Baş boyun kanserlerinin ortalama %25'i larinks kanseridir, genellikle orta yaş ya da ileri yaş (5., 6. ve 7. dekalarda) erkeklerde grlmektedir⁸.

Larinks kanserinin ortaya çıkmasında yaş, sigara ve alkol tüketimi, meslek, beslenme şekli, ilaçlar, radyasyon, genetik faktörler ve viral risk faktörlerinin yeri olduğu dřnlmektedir⁷.

Larinksin, fonasyon ve alt solunum yollarının korunması gibi önemli fonksiyonlarının devam ettirilebilmesi hastanın hayat kalitesinin de srekliiliği anlamına geldiğinden larinks kanserlerinde erken tanı çok nemlidir⁶.

Erken evre larinks kanserli hastalar ışın tedavisi ya da cerrahi olarak tedavi edilebilmektedir. Ancak hastaların büyük kısmı ileri evrede olduğundan tedaviler de yeterince etkili olamamakta ve total larenjektomi tercih edilmektedir⁹.

Solid tümörler bilinen tüm kanserlerin %90'ını oluşturmaktadır. Tümör, mutasyonlu tek bir hcrenden gelişmekte, sonuçta morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır, ayrıca normal dokuyu istila edebilmekte ya da uzak organlara metastaz yapabilmektedir¹⁰. Son yıllarda genetik, epigenetik veya somatik değişimlere ek olarak tümör mikroçevresinin de, malign progresyon ve metastazda önemli bir faktör olduğu, geleneksel anti-tümör tedavilerine cevabı etkilediği dřnlmektedir¹¹.

Hücresel mikroçevredeki değişimler, azalmış oksijen miktarı sonucunda hipoksi ya da anoksi meydana gelmektedir¹⁰. Solid tümörlerin en yaygın özelliği olan ve en

önemli çevresel streslerden biri hipoksidir. Hipoksinin kanser gelişiminde önemli ve kompleks bir rolü vardır¹¹.

İnsan embriyonik kök hücreleri, blastositin iç hücre kitlerinden elde edilir, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme (pluripotensi) ve kendini yenileyerek (self-renewal) prolifer olma özelliğine sahiptir, bu nedenle gelişim mekanizmasının incelenmesi ve dejeneratif hastalıkların tedavisinde transplantasyon için sınırsız hücre kaynağı sağlaması bakımından oldukça önemlidir^{12,13}.

Pluripotent hücrelerle yapılan çalışmalarda düşük oksijen seviyelerinde artmış proliferasyon gözlenmektedir. Oksijen konsantrasyonunun fizyolojik seviyenin altına düşmesi, in vitroda insan embriyonik kök hücrelerinin devamlılığının sağlanması, spontan farklılaşmanın azalmasını sağlamakta, kendini yenilemeyi desteklemektedir. Bu nedenle atmosferik oksijen seviyesinin altında, proliferasyon miktarı ve pluripotent hücre sayısı artmaktadır¹³. Embriyonik kök hücreler ve kanser hücreleri birkaç açıdan birbirine benzemektedir¹⁴. Kök hücre ve kanser hücreleri arasındaki benzerlikler her iki grubun da gen ekspresyonunun düzenlenmesinde benzerliklerin olabileceğini düşündürmektedir¹⁵.

Bu çalışmada, larinks kanseri hastalarında hipoksinin indüklediği faktörler olan HIF-1 α ve HIF-2 α ile embriyonik kök hücre genleri olan SOX2, OCT4, NANOG ile CD133, ESRRA genlerinin ekspresyon düzeyini saptamak ve hastalığın klinik özellikleriyle olası ilişkilerini ortaya çıkarmak ayrıca Hep2 larinks kanseri ve FaDu farenks kanseri hücre serilerinde hipoksinin HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA genleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Larinks Anatomisi

Larinks çeşitli stromal ve epitelyal dokulardan oluşmuş kompleks bir organdır¹⁶. Larinks; boyunda, orta hatta dil köküyle trakea arasında yer alan yanlarda ise büyük damarlarla komşuluğu olan kıkırdak çatı üzerine membranlar, ligamanlar ve kasların oturmasıyla oluşmuş bir organdır. Konuşma, solunum ve koruma gibi temel fonksiyonları vardır. Yeni doğanlarda 1-4 servikal vertebralar arasında yer alan larinks, puberteye kadar aşağıya iner. Puberte sonrası erkeklerde daha belirgin olmak kaydıyla büyüyerek 3-6 servikal vertebralar arasında normal yerini alır⁶.

Larinks üst tarafta hyoid kemik ile komşu olup alt tarafta trakea ile devam ederken, arka tarafında laringofarinks vardır, ön tarafında ise deri, *Facia superficialis*, *M. platysma* ve *Fascia cervicalis* ile komşudur¹⁷.

Dil kemiği olarak bilinen hyoid kemik, anatomik olarak larinksten ayrı olsa da, tirohiyoid membran ve ekstrinsik kasların tutunmasıyla fonksiyonel olarak larinksin bir parçası olarak çalışır⁶.

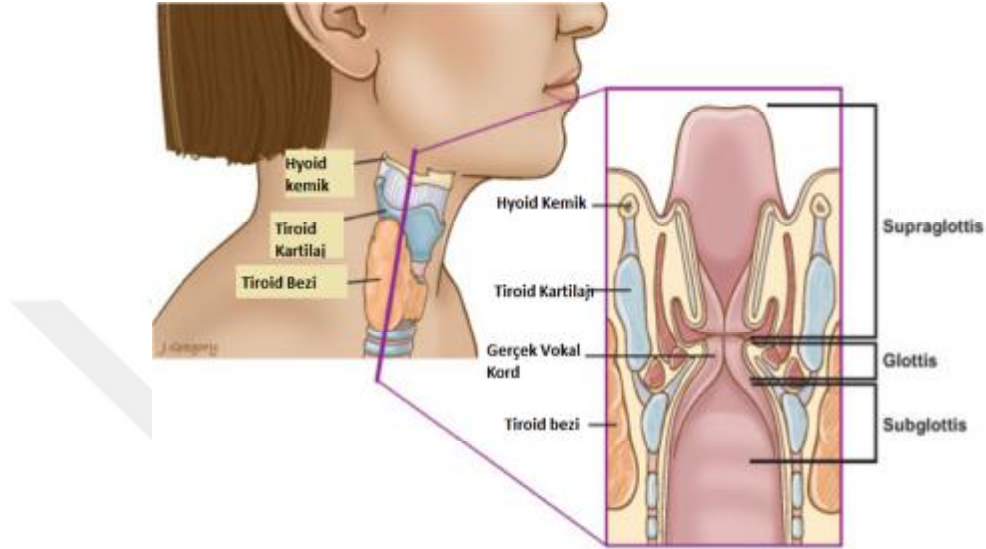
Larinksin yapısında üç çift, üç tek olarak dokuz tane kıkırdak vardır. Çift kıkırdaklar; aritenoid, kornikulat, kuneiform; tek kıkırdaklar ise epiglottis tiroid, krikoid'dir⁶. Larinksin ana kıkırdakları olan tiroid, krikoid ve aritenoid hiyalin tip kıkırdak, epiglottis elastik tip kıkırdaktır. Tiroid ve krikoid kıkırdakların kalsifikasyonu yaşla artar, tiroid kıkırdak aynı zamanda ossifikasyona uğrar¹⁶.

Larinkste lenfatik kanallar mukozal (yüzeysel) ve submukozal sistem olarak seyreder. Yüzeysel sistem, larinksin sağ ve sol yarısı arasında bağlantı yapmaz. Derin lenfatik sistem kanserlerde daha önemlidir. Larinksin supraglottik, glotik ve subglottik bölgeleri submukozal bağ dokuda yer alan bariyerlerle birbirinden ayrılmışlardır⁷. Larinks kavitesi (endolarinks), farinksle ilişkili olan larengeal girişten, trakea ile devam eden krikoid kıkırdak alt kenarına kadar devam eder. Endolarinkste kenarlardan kaynaklanıp, iç kısma doğru uzanan sağlıklı sollu bir çift plika vardır. Üstteki plikalara ventriküler band, alttakine vokal kord denir. Vokal kordlar larinksi üç bölgeye ayırır (Şekil 2.1)⁶.

Supraglottik Bölge: Epiglottisin ucundan gerçek korda kadar uzanır, ariepiglottik kıvrım, yalancı vokal kordları ve ventrikülleri içerir.

Glottik Bölge: Vokal kordlar ve onları birleştiren anterior komissürden oluşmaktadır.

Subglottik Bölge: Gerçek vokal kordların alt sınırıyla 1. trake kıkırdığı arasında yer alan alandır¹⁶.



Şekil 2.1. Larinks Anatomisi¹⁸.

2.2. Larinks Embriyolojisi

Solunum primordiyumu, ilkel farinks ventral duvarın kaudal ucunda orta hatta yaklaşık 28. gününde laringotrakeal oluk olarak başlar. Laringotrekeal oluğun endodermal döşemesi, akciğer epitelini, larinks, trakea ve bronşların epitel ve bezlerini oluşturur. Bu yapılarıdaki bağ doku, kıkırdak ve düz kaslar ön bağırsak çevresindeki splanknik (iç organlar) mezodermden gelişir. Dördüncü hafta sonunda, laringotrekeal oluk, ön bağırsak kaudal ucunda ventralde yerleşik laringotrekeal divertikulumu oluşturur. Divertikulum uzadıkça splanknik mezoderm tarafından kuşatılır ve distal ucu yuvarlak solunum tomurcuğunu oluşturur. Laringotrekeal uzantı kısa zamanda primordial farinksten ayrılır, ancak primordial laringeal giriş ile bağlantısı devam eder. Laringotrekeal diverticumdaki gelişen trakeözefageal katlantılar, trakeözefageal septum oluşturmak üzere birleşir. Laringotrakeal tübün farinkse açıldığı yer, primordiyal laringeal girişi oluşturur.

Larinksin epitelyal döşemesi endoderm, laringeal kıkırdaklar ise mezenşimden gelişirler. Laringotrakeal tübün kranial ucundaki mezenşim hızla çoğalarak aritenoid

şişkinlik çiftlerini oluşturur. Dile doğru gelişen bu şişkinlikler, yarık şeklindeki deliği T harfi biçimli laringeal girişe ve gelişmekte olan laringeal lümeni bir yarığa dönüştürür. Larengal epitelin hızla çoğalması geçici olarak larengal lümenin tıkanmasıyla sonuçlanır. Onuncu haftaya kadar larinks yeniden kanalize olur. Yeniden kanalize olma işlemi sırasında larengal ventriküller oluşur. Larinks ve epiglottisin büyümesi doğumdan sonraki üç yılda hızlıdır. Bu zaman içinde epiglottis yetişkin şeklini alır¹⁹.

2.3. Larinks Histolojisi

Yenidoğan larinksinde vokal kord haricindeki bölgeler silli kolumnar epitelle döşelidir. Skuamöz epitel (yassı epitel) altıncı aydan itibaren yalancı vokal kordlarda görülmeye başlar. Epiglottisin ön yüzü çok katlı yassı epitelle örtülü, arka tarafının üst kısmı ise çok katlı yassı epitelle örtülüken, alt kısımda yassı epitelle silli kolumnar epitel birlikte bulunur. Sigara içmeyen yetişkinlerde, supraglottik ve infraglottik bölgelerde, skuamöz epitel, silli epitel ile bir arada bulunurken, glottik bölge çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Sigara içenlerde larinksin silli solunum epiteli, skuamöz epitele dönüşmüştür²⁰.

2.4. Larinks Fizyolojisi

2.4.1. Sfinkter (koruma) Fonksiyonu:

Yutma sırasında larinks kapanarak gıdaların girişinde akciğerleri korur⁷.

2.4.2. Solunum Fonksiyonu:

Solunum medulladaki merkez ile düzenlenmektedir. Larinks solunum yolunun bir parçası olup, akciğerlere hava giriş çıkışını kontrol edebilecek bir yerleşime sahiptir. Larinks inspirasyon ve ekspirasyon safhalarında diğer solunum yolu elemanları ile eş zamanlı olarak hareket eder. İnspirasyon sırasında diyafram aşağı doğru iner ve glottis açılır²¹.

2.4.3. Konuşma Fonksiyonu:

Konuşma ağız, dil, dudak, damak, farenks, larinks, akciğer, diyafram, karın ve boyun kaslarının uyum içinde çalışması ile sağlanır. Larinks sesin temel dalga formunu yaratır²¹.

2.5. Larinks Kanseri

2.5.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Kanser, genetik ve epigenetik değişimler ile oluşan bir hastalık olup ana özelliği gen ekspresyon profillerinin düzeninin değişmesi ve moleküler ağların bozulmasıdır. Mutasyonlar ve genetik instabilite, tümör hücrelerine uyum sağlama ve proliferasyon yeteneği kazandırırken epigenetik faktörler tümörlere ek olarak farklı avantajlar sağlamaktadır^{1,22}.

Baş-boyun kanserleri, oral kavite, farinks, larinks, paranasal sinuslar ve nazal kavitenin epitelial malignitelerini tanımlamaktadır. Baş-boyun kanserleri, tüm kanserlerin %6'sını oluşturmaktadır, kanserden ölümlerin ise %5'ine neden olmaktadır ve sıklık sırasına göre tüm kanserler arasında altıncı sırada yer almaktadır. Her yıl dünyada yaklaşık 650.000 yeni olgu geliştiği, ancak hastaların %40-50 kadarının 5 yıl hayatta kalabildiği tahmin edilmektedir^{3,4,5}.

Larinks kanseri dünya genelinde yeni tespit edilen malignitelerin yaklaşık %2.4'ünü oluşturmaktadır. Baş boyun kanserlerinin ortalama %25'i larinks kanseridir, genellikle orta yaş ya da ileri yaş (5., 6. ve 7. dekalarda) erkeklerde görülmektedir^{7,8,21}. Dünya sağlık örgütünün GLOBOCAN projesi 2012 verilerine bakıldığında Küba yılda 7,6/100.000 insidans ile birinci sırada yer almaktadır. Küba'yı Macaristan, Ermenistan ve Gürcistan takip etmektedir. Hastalığın Türkiye insidansı ise 4/100.000'dir. Türkiye'yi 3.9/100.000 ile Fransa, 3.8/100.000 Belarus ve Belçika takip etmektedir²³.

Sağlık bakanlığının 2015 verilerine göre Türkiye ile gelişmiş ülkeler arasındaki en önemli fark tütün ürünlerinden kaynaklanan kanser sayısının yüksekliğidir. Türkiye'de akciğer kanserinin insidansı 37,5/100.000 ve larinks kanserinin insidansı 4,2/100.000 olarak saptanırken, bu oranlar AB ülkelerinde sırasıyla yüzbinde 31,6 ve 3,3 olmaktadır²⁴.

Sağlık Bakanlığı'nın 2013 yılı verilerine göre Türkiye'de erkeklerde larinks kanseri en sık görülen 6. kanser olarak belirtilmektedir²⁵. Larinks kanseri dünya genelinde erkeklerde kadınlardan 6 kat daha fazla görülmektedir²⁶.

Larinks kanserli bir hastaların %10-24'ünde ikinci bir kanser gelişebilmektedir. Hastaların %11-19'unda ikinci tümör tedaviden sonraki 5 yıl içinde, %30'unda ise 10 yıl içinde gelişmektedir. Larinks kanserlerin %1'inde senkronize kanserler görülürken, %5-10'unda farklı zamanlarda kanser görülmektedir²⁷.

2.5.2. Etiyoloji

Larinks kanserinin ortaya çıkmasında yaş, sigara ve alkol tüketimi, meslek, beslenme şekli, ilaçlar, radyasyon, genetik faktörler ve viral risk faktörlerinin yeri olduğu düşünülmektedir⁷. Son dönemde yapılan çalışmalarda kahve tüketiminin de larinks kanser riskini arttırdığını göstermiştir²⁸.

Larinks kanseri olan hastaların yaklaşık %95'inin geçmişine bakıldığında tümörün ortaya çıkışından önce sigara ve alkol tüketimi olduğu görülmektedir. Baş boyun kanserli hastaların küçük bir grubu hiç sigara ya da alkol tüketmemiş kişilerdir ki bu bireylerde kanser lokasyonu genellikle larinks olmamaktadır. Sigara geçmişi olmayan hastalarda baş boyun tümörlerinin en sık geliştiği yerler oral kavitede özellikle dildir. Sigara içmeyen hastaların büyük kısmı kadındır ve bu grupta 80 yaşın üzerinde ve 40 yaşın altında bireyler bulunmaktadır. Sigara ve alkol tüketim geçmişi olmayan kişilerde larinks kanserinin görülmesi çevresel maruziyet, gastroözafagal reflü, virüs enfeksiyonu, beslenme şekli, radyasyon ve bireysel özellikler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Sigara ve alkol kullanmayan larinks kanser hastaları ev ya da iş çevrelerinde pasif olarak sigara dumanına maruz kalabilmektedir²⁹.

Katı yağ kullanımına bağlı ev içi hava kirliliği genel olarak hastalıkların %2,6'sından sorumludur. Yapılan çalışmalarda bu durumun servikal neoplazi, oral, nazofarenks, farinks ve larinks kanseri ile ilişkili bulunduğu saptanmıştır³⁰.

Gastroözafageal reflü nedeniyle larinkste oluşan kronik inflamasyon kronik larenjit ve kanser için risk faktörü oluşturduğunu belirten makaleler yanında, reflünün larinks kanserine neden olduğuna dair yeterince kanıt olmadığını belirten makaleler de bulunmaktadır^{29,31}.

HPV'nin (Human Papiloma Virus) bazı serotipleri epitelyal neoplazilerin görülmesi ile ilişkilendirilmiştir. Baş boyun bölgesinde yüksek riskli HPV serotipleri skuamöz hücre karsinomlarında görülmektedir, ancak HPV enfeksiyonunun larinks kanseri ile ilişkisi netleşmemiştir^{29,32,33}.

Vitamin C, likopen ve flavinoid gibi antioksidanları içeren sebze ve meyvelerin larinks kanserine karşı koruyucu rolü olabileceği belirtilmektedir. Larinks kanser riski kırmızı et, işlenmiş gıdalar ve şeker tüketimi ile artmaktadır²⁹. Tipik bir Akdeniz diyeti, zeytinyağı gibi doymamış yağ asidi tüketimi, sebze, meyve, bitkisel proteinler, tam tahıllılar, balık, az miktarda alkol ve düşük kırmızı et tüketimi ile karakterizedir. İtalya'da yapılan bir çalışmada Akdeniz diyeti uygulayan bireylerde oral kavite, farinks ve larinks kanser riskinin azaldığı saptanmıştır³⁴.

Radyoterapi tedavisi tiroid ve baş boyun sarkomları için risk faktörüdür ancak radyoterapinin skuamöz hücreleri baş boyun kanseri ile direk bir ilişkisi saptanmamıştır. Radyoterapi sadece laringeal papilomatoz tedavisinde larinks skuamöz hücre karsinomuyla ilişkili bulunmuştur²⁹.

Büyük ailelerle yapılan çalışmalarda baş boyun kanserli hastaların 1. dereceden akrabalarında baş boyun kanserinin görüldüğü saptanmıştır. Bu durumda DNA tamir sistemindeki kalıtsal farklılıklar, karsinojenleri metabolize eden sistemlerin etkinliği, hücre döngüsü kontrol sistemi gibi faktörlerin tek tek ya da birlikte etkisi görülmektedir. Sigara karsinojenleri ve alkol metabolizmasındaki çeşitli genlerin polimorfizmlerinin baş boyun kanserlerinin ortaya çıkışında etkili olduğu saptanmıştır²⁹. Son yıllarda NER yolağındaki tamir genlerinin bazı varyantlarının³⁵ ve CYP1A1 geninin varyantlarının larinks kanseri ile ilişkili olabileceği gösteren çalışmalar³⁶ olmakla birlikte bu konudaki sonuçlar tartışmalıdır³⁷.

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda baş boyun kanserlerinde ras, myc, erbB-2, EGFR, siklin D1 gibi çeşitli pro-onkogenlerin aktivasyon kazandığı, p16, TP53 gibi çeşitli tümör supresör genlerin inaktive olduğu gösterilmiştir³⁸.

Kodlama yapmayan RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'ların hücre proliferasyonu, metastaz, invazyon ve apoptoz gibi yollar aracılığı ile larinks kanser patogeneziye katkı sağladığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır³⁹.

2.5.3. Patoloji

Larinks kanserlerinin %90'dan fazlası yassı hücre kanserleridir. Bununla birlikte bu organı oluşturan tüm doku gruplarından kaynaklanan, kondrom (kıkırdak orijinli benign tümör), adenokanserler, nöroendokrin tümörler, minör tükürük bezi tümörleri, indifferansiye karsinom gibi benign ya da malign neoplazilere rastlamak mümkündür⁶.

%90-95'i yassı hücre karsinomu olan larinks kanserlerinin % 60-65'i glottik bölgede, %30-35'i supraglottik bölgede, %5'ten az kısmı subglottik bölgede ve %5'den azı da transglottik bölgede yerleşmektedir¹⁶.

Glottik Tümörler: Ön, arka komisürde ve vokal kordlarda lokalize olurlar. Bu bölge embriyolojik olarak orta hatta birleşmiş çift yapılardan oluşmuştur ve çok seyrek lenfatik dolaşıma sahiptir. Glottik tümörlerin temel yayılım yolu lokal invazyondur^{6,7}.

Supraglottik Tümörler: Çoğunlukla epiglot larengeal yüzeyden köken alır ve lokal invazyonla ariepiglottik pilikalara bandlara ve ventriküllere yayılır. Bu bölge embriyolojik olarak glottik ve subglottik bölgelerden farklı şekilde tek yapı olarak gelişmiştir ve lenfatikleri superior larengeal arterleri takip ederek tirohyoid membran içine geçer ve boyunda lenf nodlarına drene olur. Bu zengin lenfatik ağ, klinikte supraglottik tümörlerin tüm T evrelerinde %25-75 sıklıkla görülen unilateral ve bilateral servikal metastazların sebebidir⁶.

Subglottik Tümörler: Primer tümörleri nadirdir. Bu tümörler inferiora doğru yayılım gösterir. Tümör mukozada sınırlıysa yayılım üst trakeaya, konus elastikus barrieri aşıldıysa krikotiroid membran yoluyla larinks dışına olur⁶.

Transglottik Tümörler: Larengeal kompartmanların en az ikisinde tutulum yapan tümörlerdir. Kıkırdak invazyonu ve paraglottik bölgeye yayılım yaparlar^{6,7}

Kanserin derecelendirilmesi (grade), mikroskop altında kanser hücrelerinin normal hücrelere ne kadar benzediğini tanımlamaktadır. Larinks kanseri için 3 derece vardır.

Grade1 (Düşük Grade) Kanser hücreleri normal larinks hücrelerine oldukça benzemektedir (iyi differansiye).

Grade 2 (Orta Grade) Kanser hücreleri normal larinks hücrelerine benzemektedir (orta derecede differansiye).

Grade 3 (Yüksek Grade) Kanser hücreleri normal larinks hücrelerine benzememektedir (az differansiye)⁴⁰.

Yapılan çalışmaların bir kısmında histolojik farklılaşmanın derecesinin, nüks oranını ya da sağkalımı etkilemediği gözlenmiştir. Bazı çalışmalarda ise G3 tümörlerin, G2 ve G1 tümörlere göre daha yüksek proliferasyona sahip olduğunu ve tümör nüksünden sorumlu olduğunu göstermiştir⁴¹.

Epidermoid kanserler, larinksin en fazla görülen neoplazmlarıdır. Ortalama %95 oranında görülürler. Larinksi döşeyen yassı epitelden gelişirler. İndifferansiye ve verrüköz (epidermoid karsinomun seyrek rastlanan iyi diferansiye bir formudur) kanserler daha azdır. Larinksin prekanseröz lezyonları çoğunlukla yassı epitel kanserine dönebilir. Larinksin yassı epitel dışı tümörleri %1-2, epitel kökenli olanları %98 oranındadır⁷.

Larinkste skuamöz hücreli karsinom dışında; verrüköz karsinom, küçük hücreli (nöroendokrin) karsinom, bazaloid skuamöz karsinom, lemfo-epitelioma - benzeri karsinom, adenokarsinom, sarkomatoid karsinom görülebilmektedir¹⁶.

Larinksin bening tümörleri, tüm larinks tümörlerinin %5'ini oluşturmaktadır. En sık karşılaşılan papillomadır. Diğer tipler arasında kondromlar, hemanjiomlar, miyoblastomlar, lipomlar, fibroma ve nörofibromlar sayılabilir⁴².

2.5.4. Tanı

Larinksin, fonasyon ve alt solunum yollarının korunması gibi önemli fonksiyonlarının devam ettirilebilmesi, hastanın hayat kalitesinin de sürekliliği anlamına geldiğinden larinks kanserlerinde erken tanı çok önemlidir⁶.

Larinks kanser tanısında hastanın öyküsünde semptomların süresi, sigara ve benzer karsinojenlere maruz kalma, aile öyküsü ve tıbbi geçmişi sorgulanır. Tanı için fiziksel muayene, radyolojik değerlendirme, endoskopi ve biyopsi yapılmaktadır⁶.

Larinks kanser olgularında, semptom ve bulgular arasında seste kabalaşma, yutma zorluğu, boyunda kitle, boğaz ağrısı, kulak ağrısı, solunum problemleri ve aspirasyon bulunmaktadır. Glottik tümörlerde, vokal kordlarda oluşan kalınlık ve şekil değişikliklerine bağlı vibrasyon bozulduğu için ses kabalaşır ve bu hastalar erken dönemde doktora başvururlar. Supraglottik tümörlerde genelde tümör büyük boyutlara ulaştığında ses kısıklığından önce, yutma güçlüğü, solunum problemleri ve aspirasyon şikayetleri görülür. Bu hastalar genelde ileri evrelerde başvururlar. Supraglottik kanserler erken dönemde metastaz yaptıkları için hastalar boyunda şişlik şikayeti ile de

başvurabilirler. Subglottik tümörler de supraglottik tümörlerde olduğu gibi geç bulgu verirler ve genelde solunum sıkıntısı ya da tümörün kordları tutmasıyla yine disfoni ile başvururlar²¹.

2.5.5. Evreleme

Tanı anında kanserin evresi, önceki, benzer evrede hastaların deneyim ve tedavi sonuçlarına göre uygun tedavinin seçilmesinde prognozu etkileyen kritik unsurdur. Bunun yanında, doğru evreleme, tedavi sonuçları ve klinik araştırmaları değerlendirmek, merkezler arası bilgi alışverişi ve karşılaştırmayı sağlamak, klinik ve ürüne dönüştürebilecek kanser araştırmalarına temel oluşturmak için önem taşımaktadır. Dünyada farklı evreleme sistemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasındaki fark, uygulayıcıların amaç ve ihtiyaçları ile toplum gözlemlerine dayanmaktadır. En kullanışlı evreleme sistemi “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) ve “The International Union for Cancer Control” (UICC) tarafından geliştirilen tümör-nod-metastaz (TNM) sistemidir. TNM sistemi kanserleri, primer tümör boyut ve uzanımı (T), bölgesel lenf nodu tutulmu (N) ve uzak metastazın olup olmamasına (M) göre sınıflandırmaktadır (Çizelge 2.1)⁴³

Çizelge 2.1. TNM evreleme sistemi^{6,43}

Primer Tümör (T) Tx: Primer tümör için değerlendirilme yapılamamaktadır. T0: Primer tümör gösterilememektedir. Tis: Karsinoma in situ
Supraglottis T1: Tümör tek bir supraglottik alt bölgesiye sınırlıdır, vokal kord hareketleri normaldir. T2: Tümör supraglotisin birden fazla alt bölgesini, glottisi veya larinks fiksasyonuna yol açmaksızın supraglottik bölge dışındaki anatomik yapıları tutmuştur. T3: Tümör larinks içinde sınırlı olmakla birlikte vokal kord hareketi sınırlı ve/veya postkrikoid, preepiglotik, paraglottik boşluğa ve/veya tiroid kartilaj iç korteks tutulumu mevcuttur. T4a: Tam kat tiroid kartilaj destrüksiyonu ve/veya boyun yumuşak dokuları, tiroid, trake, özefagus, dil kökü tutulumu mevcuttur. T4b: Prevertebral boşluğu, karotid artri veya mediastinal yapıların tutulumu mevcuttur.
Glottis T1: Tümör vokal kordlar ile sınırlıdır, kord hareketleri normaldir T1a: Tümör tek vokal kordda bulunur. T1b: Her iki vokal kordda tümör mevcuttur. T2: Tümör supraglotis ve/veya subglotise uzanmakta ve/veya kord hareketlerinde kısıtlılık mevcuttur. T3: Tümör larinks içinde sınırlıdır ve vokal kord hareketlerinde kısıtlılık vardır ve/veya tiroid kartilaj iç korteks destrüksiyonu vardır. T4a: Tam kat tiroid kartilaj destrüksiyonu ve/veya boyun yumuşak dokuları, tiroid, trake, özefagus, dil kökü tutulumu mevcuttur. T4b: Prevertebral boşluğu, karotid arteri veya mediastinal yapıların tutulumu mevcuttur.
Subglottis T1: Tümör subglottise sınırlıdır. T2: Tümör vokal kordlara uzanım mevcuttur. Kord hareketleri kısıtlanmış da olabilir. T3: Tümör larinks içinde sınırlıdır ve kord fiksasyonu vardır. T4a: Tam kat tiroid kartilaj destrüksiyonu ve/veya boyun yumuşak dokuları, tiroid, trake, özefagus, dil kökü tutulumu mevcuttur. T4b: Prevertebral boşluğu, karotid arteri veya mediastinal yapıların tutulumu mevcuttur.
Bölgesel Lenf Nodları (N) Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir. N0: Bölgesel lenf nodu metastazı bulunmamaktadır.. N1: Aynı tarafta en büyük boyutu ≤3 cm olan tek lenf nodu metastazı vardır. N2: Aynı tarafta en büyük boyutu >3 cm ancak ≤6 cm tek lenf nodu metastazı veya

aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı veya iki taraflı ya da karşı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı vardır. N2a: Aynı tarafta en büyük boyutu >3 cm ancak ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı vardır. N2b: Aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı vardır. N2c: İki taraflı ya da karşı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı vardır. N3: En büyük boyutu >6 cm olan lenf nodu metastaz(lar)ı vardır.	
Uzak Metastaz (M) M0: Uzak metastaz yoktur M1: Uzak metastaz vardır	
Anatomik Evre / Prognostik Gruplar	
Evre 0	Tis N0 M0
Evre I	T1 N0 M0
Evre 2	T2 N1 M0
Evre 3	T3 N0 M0 T1 N1 M0 T2 N1 M0 T3 N1 M0
Evre 4a	T4a N0 M0 T4a N1 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N2 M0 T4a N2 M0
Evre 4b	T4b Herhangi N M0 Herhangi T N3 M0
Evre 4c	Herhangi T Herhangi N M1

2.5.6. Metastaz

Larinks kanseri metastazları daha çok lenfatik yolla olduğundan boyunda lenf bulunuşu prognozda önem kazanır. Boyun metastazları larinksin anatomik bölgelerine göre değişir. Servikal metastaz riski tümörün diferansiyasyonu, evresi, lokalizasyonuna bağlıdır. Larinks kanserler %24-49 oranında boyun metastazı yapar.

Supraglottik kanserler kısa sürede boyun metastazı yaparlar. Bu bölge lenfatiklerden çok zengindir, boyuna metastaz oranı %25-50 arasında değişir. Glottik kanserlerin lenfatik yayılımı daha geç olur. Vokal kord dışına taşan kanserlerde yayılım riski artar. Glottik lezyonlarda metastaz oranı %5-7, ileri evrelerde %14-15'e ulaşır.

Larinks kanserlerinde uzak metastaz %50 oranında ilk 9 ayda ve %90 oranında ilk iki yıl içinde görülür. İleri evre T3-T4 tümörlerde ve boyun metastazı olan veya rekürensli hastalarda daha sık ortaya çıkar⁷.

2.5.7. Tedavi

Erken evre larinks kanserli hastalar yüksek bölgesel kontrol oranı ile ışın tedavisi ya da cerrahi olarak tedavi edilebilmektedir. Ancak hastaların büyük kısmı ileri evrede olduğundan tedaviler de yeterince etkili olamamaktadır. SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) verilerine göre Larinks kanser hastalarının %45'i kanser henüz primer bölgesindeyken saptanırken, %47'sinde lenf nodlarına yayıldıktan sonra ya da primer bölgenin dışında saptanmaktadır. Türkiye'de ise yüksek sigara kullanımı ve semptomların geç fark edilmesinden dolayı ilerlemiş evre kanserleri görülmektedir⁴⁴. Lokal ileri evre tümörlerinde kemo-radyoterapi ile birlikte organ koruma tedavilerindeki ilerlemeye rağmen; Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde bu yöntem standart tedavi olarak uygulanmamakta, bu ülkelerde genellikle kemoterapi ile birlikte ya da kemoterapisiz radyoterapi ile cerrahi tedavi birlikte uygulanmaktadır. Cerrahi sonrası yardımcı radyoterapi yüksek riskli hastalarda loko bölgesel nüks riskini azaltmak için başvurulana tedavidir⁴⁴.

2.6. Kanser Oluşumu

Tümör oluşumu, aşamalı bir süreçtir ve bu süreçte genetik değişimlerle normal hücreler malign hale dönüşür. Kanser hücreleri kendi büyüme sinyallerini oluşturabilir, anti-büyüme sinyallerine duyarsızdır, apoptozdan kaçabilir, sonsuz replikatif

potansiyeye sahiptir, anjiyogenezi devam ettirir, sonuçta doku invazyonu ve metastaz yapar. Bu fizyolojik değişimlerin her biri tümör gelişimi sürecinde kazanılan yeni özelliklerdir. Normal hücreler sessiz durumdan, aktif proliferatif duruma geçmek için mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duymaktadır. Bu sinyaller transmembran reseptörleri aracılığı ile hücrelere aktarılır. Normal hücreler büyüme sinyali yokluğunda proliferere olmaz. Normal dokuda çeşitli antiproliferatif sinyaller, hücrenin dinlenme halini ve doku homeostazını devam ettirir. Bu sinyaller solübl büyüme inhibitörleri veya ekstrasellüler matriks ya da komşu hücre yüzeyindeki inhibitörler olabilir. Bu anti büyüme sinyalleri de transmembran hücre yüzey reseptörü tarafından hücre içine aktarılır. Kanserleşme sürecinin başındaki hücre bu antiproliferatif sinyallerden kaçmaktadır. Tümör hücre popülasyonunun artışı sadece hücre proliferasyonu ile değil aynı zamanda hücre ölümü ile de kontrol edilmektedir. Yapılan çalışmalarda kazanılmış apoptoz direncinin tüm kanser tiplerinde görüldüğü belirtilmektedir. Hayflick yaptığı çalışmalarda kültüre hücrelerin belirli bir replikatif potansiyeli olduğunu, hücrelerin belirli sayıda bölünmeden sonra senesense girdiğini belirlemiştir. Tümör hücreleri, tümör progresyonu sırasında limitisiz bir replikatif potansiyel kazanarak ölümsüz olmaktadır, bu durum da malign büyüme durumunun devamı için oldukça önemlidir. Oksijen ve besin takviyesi, hücre fonksiyonu ve canlılığı için oldukça önemlidir. Bir dokudaki hücreler kılcal kan damarlarına yaklaşık 100 µm mesafededir, organ oluşumu sırasında bu mesafe damarların koordineli büyümesi ile korunmaktadır. Damarlara yakınlıktan dolayı doku içinde proliferere olan hücrelerin, kan damarı büyümesini destekleyecek yeteneği olduğu düşünülse de anormal proliferasyon gösteren lezyonlardaki hücrelerde anjiyogenik kabiliyet, büyümelerini kısıtlamak için ilk başlarda görülmemektedir. Daha büyük boyuta ulaşabilmek için yeni oluşan neoplaziler anjiyogenik yetenekler geliştirmelidir. Tümör gelişimi sırasında anjiyogenezi indükleyip devamını sağlama yeteneği hücreler tarafından kazanılmaktadır. Kanser gelişimi sürecinde, primer tümör kitlesindeki bazı hücreler, komşu dokuyu istila ederek, uzak bölgelere hareket eder ve oralarda yeni koloniler kurar. Bu metastazlar kanserden ölümlerin büyük kısmından sorumludur. İnvayon ve metastaz kabiliyeti, kanser hücrelerinin primer tümör dokusundan kaçarak, vücutta en azından ilk aşamalarda besin ve alan kısıtlaması olmadan yeni bir bölgede kolonize olmasını sağlar⁴⁵

2.7. Hipoksi ve Kanser

Solid tümörler bilinen tüm kanserlerin %90'ını oluşturmaktadır. Tümör, mutasyonlu tek bir hücreden gelişmekte, sonuçta morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır, ayrıca normal dokuyu istila edebilmekte ya da uzak organlara metastaz yapabilmektedir¹⁰.

Tümör oluşumu hücre döngüsü kontrol noktalarında, genomik instabilitenin artmasıyla genetik, epigenetik veya somatik değişimlerin neden olduğu hasarlar sonucu oluşmaktadır. Bu değişimler, kanser hücrelerinin normal hücrelerden farklı olarak, büyüme inhibitörlerine karşı duyarsızlaşmasına, ekzojen büyüme faktörleri yokluğunda proliferasyona devam etmesine, apoptozdan kaçmasına, telomeraz yeniden aktivasyonu ile limitsiz bölünme özelliği kazanmalarına, anormal anjiyogeneze, immun sistemden kaçma, invazyon ve metastaz yeteneği kazanmalarına neden olmaktadır. Son yıllarda genetik, epigenetik veya somatik değişimlere ek olarak tümör mikroçevresinin de, malign progresyon ve metastazda önemli bir faktör olduğu, geleneksel anti-tümör tedavilerine cevabı etkilediği düşünülmektedir⁴⁶.

Tümör progresyonu, tümör hücre mikroçevresindeki değişimlerin eşlik ettiği hızlı hücre bölünmesi ile karakterizedir. Hücresel mikroçevredeki değişimler, azalmış oksijen miktarı ve sonuçta hipoksi ya da anoksiye neden olmaktadır. Yeni oluşan tümörler yaklaşık 1mm'lik büyüme için yeni kan damarları oluşturmaktadır. Ancak oluşan bu yeni damar ağı, dilatasyon, tamamlanmamış endotel duvarı ve membranı, sızdırma gibi anomaliler ile normal dokulardakinden fonksiyonel ve yapısal olarak farklılık göstermektedir. Bu anomaliler tümör hücrelerine düzensiz kan akışına ve bozulmuş O₂ ve besin taşınımına, sonuçta da hipoksik ve anoksik bölgeler oluşmasına neden olmaktadır. Hipoksi tümör hücre proliferasyonunu ve malign progresyonu etkileyen önemli bir faktördür¹⁰. Solid tümörlerin en yaygın özelliği olan ve en önemli çevresel streslerden biri hipoksidir. Hipoksinin kanser gelişiminde önemli ve kompleks bir rolü vardır (Şekil 2.2)⁴⁶.



Şekil 2.2. Hipoksinin kanser gelişimindeki rolü⁴⁶

- **Anti-proliferatif Sinyallere Direnç-Büyüme Faktörlerine İhtiyaç Duymama:** Hücre proliferasyonunun pro-proliferatif ve anti-proliferatif sinyallerle kontrol edildiği bilinmektedir. Hücreler, hücre dışındaki mikroçevre değişimlerine cevapta ve stres sırasında hücre büyümesinin kontrolünde çeşitli sinyal yollarına sahiptir. Hipoksik durumlarda büyümenin devam ettirilmesi için, kanser hücreleri, eksojen mitojenik büyüme sinyali yokluğuna adapte olur ve anti proliferatif sinyallere dirençli hale gelir. Hipoksik mikroçevrede kanser hücreleri, mitojenik büyüme sinyallerini kendileri arttırarak ya da bu büyüme faktörlerinin down stream yollarını sürekli aktif halde tutarak eksojen mitojenik büyüme sinyallerinden bağımsız çoğalırlar. Hipoksi, kanser hücrelerinin, hücre proliferasyonunu arttıran EGF, insülin, IGF-1, IGF-2 ve PDGF gibi büyüme sinyallerini eksprese etmesini tetikler⁴⁶.
- **Apoptoz:** Tümörler hücre proliferasyonu ve ölüm arasındaki dengesizlik sonucu kontrolsüz olarak büyümektedir. Tümör oluşumunda apoptozdaki düzensizlikler oldukça kompleks ve tümör oluşumu ile sonuçlanan birbiriyle bağlı genetik ve epigenetik olaylar ile ilişkilidir. Normal hücrelerin aksine, kanser hücrelerinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik faktörler arasındaki dengenin bozulması, hipoksik stres,

radasyon veya kemoterapi gibi çevresel koşullarda hücre canlılığını tetiklemektedir. Hipoksi koşullarında apoptoz mekanizması tam olarak anlaşılmış değildir ancak hipoksi aracılı apoptozda ana mekanizmanın mitokondriyal geçirgenliğin değişmesi olduğu düşünülmektedir. HIF-1 α 'nın mitokondriden stoplazmaya sitokrom c salınımını tetiklediği ve Apaf-1 ve kaspaz 9 aracılığı ile p53- bağımlı apoptozun gerçekleştiği, buna karşılık Bcl-2 gibi anti apoptotik genlerin bu yolağı inhibe ettiği düşünülmektedir⁴⁶.

- **Replikatif Potansiyel:** İnsan somatik hücrelerinin belirli bir replikatif potansiyeli vardır. Belirli sayıdaki hücre bölünmesinden sonra hücreler senesense gider. Hücre senesensi, malign transformasyon riski olan hasarlı ya da strese maruz kalmış hücrelerde proliferasyonu baskılayarak kanser gelişimini inhibe eder. Çalışmalar kanser hücrelerinin senesense girmeyip ölümsüz hale girdiğini göstermektedir. Ölümsüzlük kanser hücre oluşumunda gerekli koşullardandır. İnsan kanser hücreleri ölümsüzlüğü, ya telomeraz enzim aktivitesini arttırarak telomer uzunluğunu devam ettirerek ya da telomerleri alternatif yollarla uzatarak kazanmaktadır. hTER, insan telomerazı hücre senesensinde anahtar faktörlerden biridir. Hipoksik çevrede kanser hücrelerindeki telomeraz aktivitesi artar ve hücrel ölümsüzlük tetiklenir, artan telomeraz aktivitesi MAPK aktivasyonu aracılığı ile gerçekleşir⁴⁶.
- **Anjiyogenezin İndüksiyonu:** Malign tümörlerin büyük kısmında metastaz ve lokal büyüme yeni kan damarlarının oluşumuna bağlıdır. Solid tümörlerde tümör çapının 1-2 mm artması için besin ve oksijen sağlayacak kan desteğine gereksinim vardır. Tümör gelişimi, mikrovasküler densite ve tümör içinde hipoksik mikroçevre oluşumu ile ilişkilidir. Doku hipoksisi, VEGF, IL-8, angiogenin, FGF ve PDGF gibi anjiyogenezi arttıracak anjiyogenik faktörleri indükler. VEGF fizyolojik kan damarı oluşumunda ve tümör büyümesinde patolojik anjiyogeneizde ana role sahiptir. Hipoksi HIF-1 α aktivitesini arttırarak VEGF'yi arttırır aynı zamanda anjiyogenik inhibitör olan thrombospondin aktivitesini düşürür⁴⁶.
- **İmmun Sistemden Kaçma:** Tümör mikroçevresi, kanser hücreleri dışında endotel hücreler, immün hücreler ve stromal elemanlar ile düzenlenmektedir. Kanser hücreleri ve anti-tümör immün hücrelerin bir arada bulunması uzun süredir üzerinde düşünülen bir paradokstur. Kanser hücreleri çeşitli değişimler geçirerek immün gözetimden kaçma özelliği kazanmaktadır, ancak hipoksik mikroçevrede kanser hücrelerinin immün

sistemden nasıl kaçtığı tam olarak anlaşılamamıştır. Olasılıklardan bir tanesi kanser hücrelerinin immün hasardan kaçmak için HIF-1 α bağımlı ya da bağımsız yollar aracılığı ile çeşitli immün baskılayıcı faktörler salgılamasıdır. Kanser hücrelerinin yanında, immün hücreleri de sıklıkla düşük oksijen seviyelerine maruz kalmakta ve tümörlerde ya da kan damarlarından uzak bölgelerdeki diğer mikroçevrelerde fonksiyon gösterebilme adına hipoksiye adapte olmak zorundadır. Monositler sürekli olarak tümör içinde toplanıp, tümör aracılı makrofajlara farklılaşmakta ve hipoksik bölgelerde birikmektedir. Hipoksi, tümör ilişkili makrofajların, mitojenik faktörler, proanjyogenik sitokinler ve HIF-1 ve HIF-2 gibi transkripsiyon faktörlerini indükleyerek immün sistemi baskılayıcı ajanlar salgılamasını stimüle etmektedir. Hipoksi aynı zamanda makrofajların ölü ya da ölmekte olan hücreleri fagosite etme ve T hücrelere antijen sunma özelliğini inhibe etmekte ve makrofajların anti-tümör etki göstermesini engellemektedir. Tümör hücreleri, anti-tümör T hücrelerinin inhibisyonuna bağlı olarak hipoksik koşullarda immün sistemden korunabilmektedir. HIF-1 α aracılı anti-inflamatuar yolak ve hipoksinin indüklediği ekstrasellüler adenozin, tümör hipoksisinin tümör koruyucu immunsupresif etkisine katkıda bulunmaktadır⁴⁶.

- **Doku invazyon ve Metastazı:** Invazyon ve metastaz kanserin indüklediği en yaygın mortalite ve morbidite sebebidir. Hipoksik ortamda kanser hücreleri sadece canlılığı sürdürme ve büyüme için değil aynı zamanda invazyon ve metastazı arttıracak değişimlere de uğrar. Klinik çalışmalar tümör hipoksisinin tümör hücre yayılımı için en önemli faktörlerden biri olduğunu göstermektedir. HIF-1 α 'nın transgenik modellerde kanser başlama ve progresyonunda ana düzenleyici olduğu çalışmalarda gösterilmektedir. Metastazın başlama aşamasının epitelyal mezenşimal transisyon (EMT) olduğu düşünülmektedir. Hipoksiyle birlikte HIF-1 α 'nın artan ekspresyonunun EMT'yi ve metastatik fenotipi arttırdığı gösterilmiştir. Hipoksinin indüklediği HIF aktivasyonu E-kaderin kaybıyla ilişkilidir, invazyon ve EMT için dönüm noktasıdır⁴⁶.
- **Genomik İnstabilite:** Genomik instabilitenin kanser hücrelerinde transformasyona neden olan hücresel değişimlerden sorumlu olduğu bilinmektedir. Genotoksik stres, hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive ederek, DNA hasar tamirine izin verecek şekilde hücre döngüsü progresyonunu ertelemektedir. DNA tamir mekanizması ve hücre döngüsü kontrol noktalarındaki genetik defektler genomik instabilite ve kansere yatkınlığa neden olmaktadır. Tümör mikroçevresi stresi olan hipoksinin de, artan

kromozomal yeniden düzenlenme, gen amplifikasyonu ve hipoksik hücrelerde kromozomlardaki fragil bölgelerin indüksiyonu aracılığı ile genomik instabiliteye neden olduğu belirtilmektedir. Hücrelerin hipoksik koşullarda kültüre edilmesinin nokta mutasyonu frekansını yaklaşık 3 kat arttırdığı gözlenmektedir. Çalışmalar hipoksinin DNA yanlış onarım genlerinin ekspresyonunu baskılayarak mutagenezi arttırdığını göstermektedir⁴⁶.

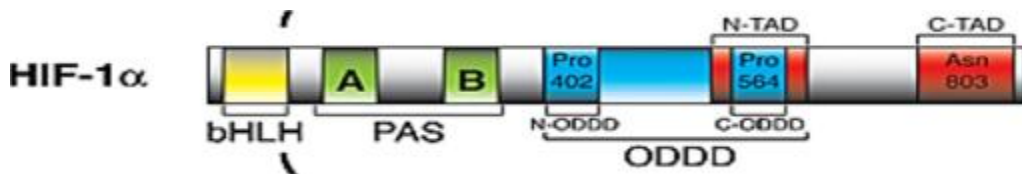
Hipoksik Hücrelerde Glikoliz: Hipoksi ve HIF-1 yolağının direk ya da indirek olarak kanserle ilgili ana olayları düzenlediği gösterilmiştir. Bu yolakların yanında hipoksi altında kanser hücrelerinin aerobik metabolizmadan anaerobik metabolizmaya adapte olması da önemlidir. Normal doku ve hücreler ATP sentezi için oldukça etkili aerobik metabolizmaya sahiptir. Hipoksik durumda ise kanser hücreleri hücrel fizyoloji ve metabolizmalarını yeni koşullara adapte etmek için oksijen bağımlı oksidatif fosforilasyon yerine oksijen bağımsız glikolizi kullanmaktadır. Hipoksik kanser hücreleri ATP sentezi için glikolizi kullanır, bu yolakta ana regülatör HIF'lardır. HIF-1, trikarboksilik asit döngüsü aktivitesini ve pruvat dehidrojenaz inhibisyonu ile mitokondriyal oksijen tüketimini azaltarak hipoksiye adaptasyona aracılık etmektedir⁴⁶. Genel olarak hipoksik tümör dokusundaki oksijen seviyesinin, normal dokulardan daha az olduğu ve yaklaşık % 1-2 ve altında olduğu kabul edilmektedir (Çizelge 2.2)⁴⁶.

Çizelge 2.2. Çeşitli dokuların fizyolojik ve hipoksik koşullardaki O₂ miktarı⁴⁷.

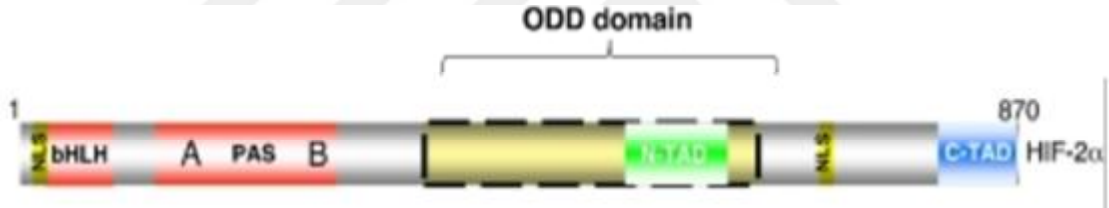
Doku/Organ	Fizyolojik (ort %O ₂)	Kanser	Hipoksi (ort %O ₂)
Beyin	4,6	Beyin Tümörü	1,7
Meme	8,5	Meme Kanseri	1,5
Serviks	5,5	Serviks Kanseri	1,2
Böbrek korteksi	9,5	Renal Kanseri	1,3
Karaciğer	4,0-7,3	Karaciğer Kanseri	0,8
Akciğer	5,6	KHDAK	2,2
Pankreas	7,5	Pankreatik Tümör	0,3
Rektal Mukoza	3,9	Rektal Karsinom	1,8

2.7.1. Hipoksinin İndüklediği Faktörler

Kanser hücreleri bu hipoksik çevreye uyum sağlamak için adaptasyon geliştirir. Hipoksiye adaptif cevap, hipoksik gen ekspresyonunun ve oksijen homeostazının ana düzenleyicisi olan HIF'lar ile sağlanır. HIF, oksijenle regüle olan alfa (HIF-1 α ve HIF-2 α), sürekli eksprese olan, stabil HIFB alt ünitelerinden oluşan PAS ailesine (PER, AHR, ARNT and SIM) dahil olan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4)⁴⁸.



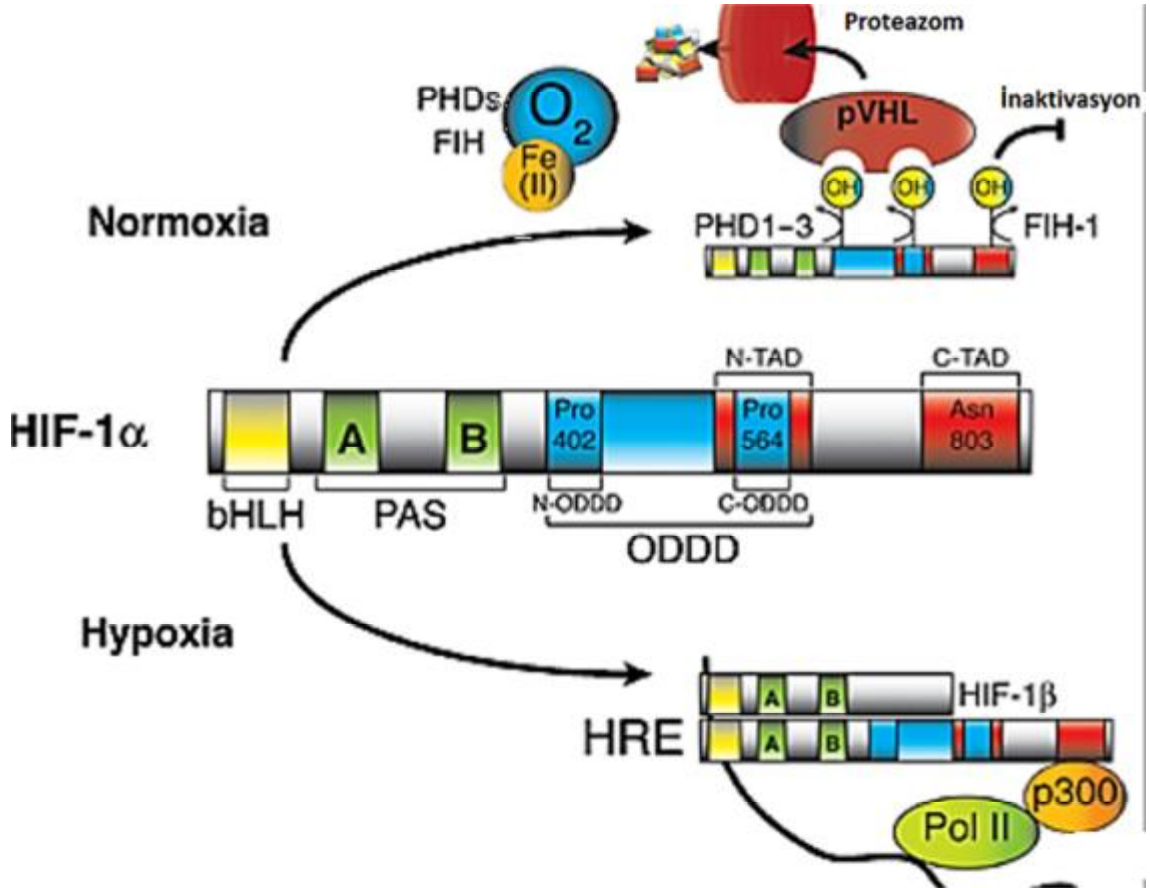
Şekil 2.3. HIF-1 α geninin yapısı⁴⁸.



Şekil 2.4. HIF-2 α geninin yapısı⁴⁹.

HIF α alt ünitelerinde N-terminal bölgedeki “basic heliks-loop-heliks” bölgesi, spesifik DNA tanıma bölgesidir. HIF'in hedef genlerinde HRE (Hypoxia Response Element) hipoksi cevap elementi denen belirli DNA bölgeleri bulunmaktadır. Hipoksi durumunda HIF α -HIFB heterodimeri HRE içeren hedef genleri aktive etmektedir. RNA polimeraz, HIF α genleri üzerindeki TAD denen transkripsiyon aktivasyon bölgelerine bağlanır. Hücrelerin HIF'ler aracılığı ile oksijeni algılayıp cevap verme mekanizması 2000'lerin başında ortaya çıkarılmıştır. Oksijen varlığında, dioksijenazlar protein hidroksilasyonunu katalizleyerek, HIF α proteinlerinde -OH grubu oluşumuna neden olur. Bu HIF-hidroksilazlar; HIF α üzerindeki PHD denen prolil hidroksilaz bölgesini tercih eden HIF-prolil hidroksilazlar ve FIH denen HIF-1 inhibe edici faktör olarak 2 çeşittir. PHD bölgeleri HIF α proteininde oksijen bağımlı degradasyon bölgesi olan

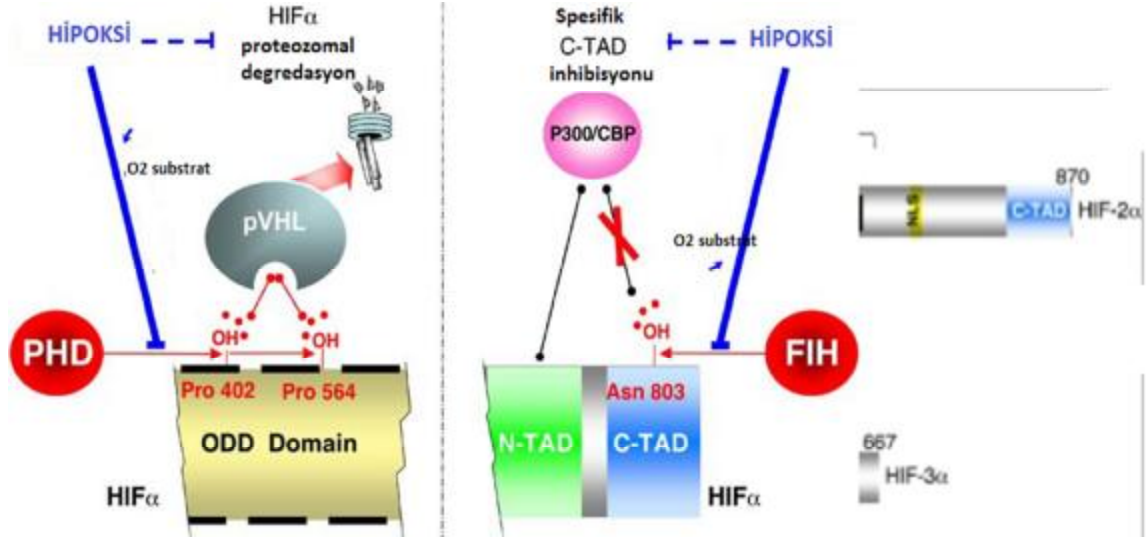
ODD bölgelerinde bulunmaktadır. Bu ODD bölgeleri hidroksillendiğinde, E3 ubiquitin ligaz komponenti olan ve VHL olarak adlandırılan von Hippel-Lidau proteinine güçlü afinite gösterir. Sonuçta HIF α altünitesi poli ubiquitine olur ve proteazom tarafından degrade edilir (Şekil 2.5)⁴⁸.



Şekil 2.5. HIF çalışma mekanizması-1⁴⁸

HIF α üzerindeki ikinci oksijen sensörü olan FIH, ortamda oksijen bulunduğunda C-terminal TAD bölgesindeki asparajin hidroksilasyonunu katalizler, bu durumda HIF α C-TAD bölgesi ve koaktivatör p300/CBP arasındaki interaksyon bozulur⁴⁹.

HIF hidroksilasyonu 2 farklı sistemle kontrol edilmektedir. Normoksik koşullarda HIF aktif PHD ile degrade edilebilir fakat eğer bu durumdan kaçan HIF olursa, o zaman devreye FIH girer ve FIH tarafından inaktive edilir (Şekil 2.6)⁴⁹.



Şekil 2.6. HIF çalışma mekanizması-2⁴⁹

Oksijen yokluğunda veya demir şelatör ya da kobalt iyonlarının verilmesi ile hidroksilaz aktivite baskılanır, HIF α VHL-aracılı yıkımdan kurtulur, birikir ve HIF β ile dimerize olur. HIF α -HIF β transkripsiyonel koaktivatör p300/CBP ile bir arada hipoksi cevap elementine bağlanır ve hipoksik genlerin ekspresyonuna yardımcı olur. HIF'in yönettiği transkripsiyonel program glikolitik mekanizma, anjiyogenez, tümör hücre canlılığı, invazyon ve metastaz gibi adaptif mekanizmalardan sorumludur⁴⁸.

2.8. Kök Hücreler

Kök hücreler, vücutta kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu hücreler mitozla çoğalarak farklı özelleşmiş hücre tiplerine dönüşebildikleri gibi, kendilerini yenileyerek daha fazla kök hücre oluşturabilirler. Farklılaşma kapasitesi ve kendini yenileme kabiliyetine göre kök hücreler birkaç tipte bulunabilir. Kök hücreler kaynaklarına göre embriyonik, erişkin, kanser kök hücresi ve indüklenmiş pluripotent hücreler olarak ayrılırken, farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak ayrılmaktadır.

İnsan embriyoları fertilizasyondan 4-5 gün sonra 50-150 hücre içeren blastosist aşamasına ulaşır. Embriyonik kök hücreleri, blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir.

Bu hücreler üç germ tabasından kaynaklanan tüm hücrelere dönüşebilme kapasitesinin yanında, sınırsız bölünme kapasitesine sahiptir.

Erişkin kök hücreler olgun dokulardan elde edilen kök hücrelerdir. Gelişimin hangi basamağında olduklarına bağlı olarak, embryodan elde edilen kök hücrelerle karşılaştırıldıklarında bu hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli daha sınırlıdır. Erişkin kök hücrelerin büyük kısmı multipotenttir ve köken aldıkları dokuya göre adlandırılır. Bu hücreler lokal doku tamiri ve rejenerasyonda önemli role sahiptir.

Kanser kök hücre teorisi kök hücre biyolojisi ile kanser çalışmalarını bir araya getiren bir alandır. Kanser kök hücreleri tümör kitlesi içindeki kök hücrelerdir. Teoriye göre orjinal tümör, bu kanser kök hücrelerinden köken alıp gelişerek, kendini yenileme ve farklılaşma ile farklı hücre tiplerine dönüşmektedir. Kanser kök hücre popülasyonları tümör kitlesi içinde küçük bir orana sahiptir ve diğer hücrelerden özel hücre yüzey antijenleri ile ayrılmaktadır. Kanser kök hücreleri farklılaşma ve kendini yenileme kapasitesi bakımından normal kök hücrelere benzeseler de büyüme kontrolünün ortadan kalkması ve kontak inhibisyon kaybı gibi özelliklere sahiptir. Geleneksel kanser tedavilerinde farklılaşmış ya da farklılaşmakta olan hücreler hedef alındığından, kanser kök hücreleri tedaviden kaçarak canlılığını devam ettirmektedir. Bu nedenle de kanser nüks ve metastazından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Kanser kök hücrelerinin kaynağına dair çeşitli hipotezler mevcuttur. Hipotezlerden bir tanesi, bu hücrelerin progenitör veya erişkin kök hücrelerin mutasyonu sonucu oluştuğunu ileri sürmektedir. Bir diğer teori ise bu hücrelerin, kök hücre benzeri özellikler kazanmış kanser hücrelerinin köken aldığını, kanser hücrelerinin geriye farklılaşma ile kök hücre benzeri özellikler kazanabileceğini iddia etmektedir.

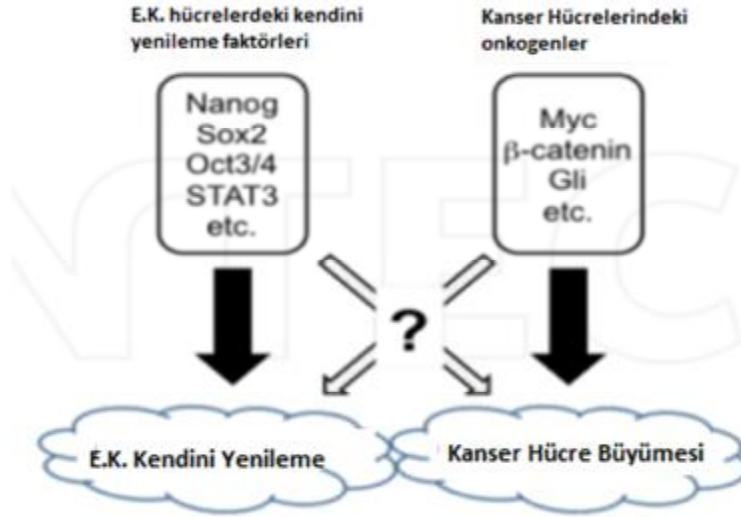
İndüklenmiş pluripotent hücreler (IPS), pluripotent özelliğe sahip olmayan erişkin somatik hücreden, spesifik genlerin indüklenmiş ekspresyonu ile elde edilmektedir. Bu hücreler, belirli kök hücre gen ve proteinlerini eksprese etme, kromatin metilasyon paterni, bölünme süresi, teratoma oluşturma ve farklılaşma kapasitesi gibi özellikleri bakımından doğal kök hücrelere benzemektedir⁵⁰.

2.8.1. Embriyonik Kök Hücre Çekirdek Transkripsiyon Faktörleri

İnsan embriyonik kök hücreleri, blastositin iç hücre kitlerinden elde edilir, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme (pluripotensi) ve kendini yenileyerek (self-

renewal) proliferere olma özelliğine sahiptir, bu nedenle gelişim mekanizmasının incelenmesi ve dejeneratif hastalıkların tedavisinde transplantasyon için sınırsız hücre kaynağı sağlaması bakımından oldukça önemlidir^{12,13}. Ancak bu hücrelerin spontan farklılaşmaya eğilimlerinden dolayı uygun olmayan kültür şartlarında kök hücre özelliklerini devam ettirmesi oldukça güçtür. In vivoda preimplante embriyolar, insan ve sığır gibi türler de dahil olmak üzere %1.5-8 gibi düşük oksijen ortamında gelişirler. Atmosferik oksijene göre %2'lik oksijen seviyesinin altında, trophoctoderm hücreleri ile karşılaştırıldığında ICM (Inner Cell Mass=İç Hücre Kitlesi) oranı anlamlı olarak artmaktadır. Pluripotent hücrelerle yapılan çalışmalarda düşük oksijen seviyelerinde artmış proliferasyon gözlenmektedir. Oksijen konsantrasyonunun fizyolojik seviyenin altına düşmesi, in vitroda insan embriyonik kök hücrelerinin devamlılığını ve spontan farklılaşmanın azalmasını sağlamakta, kendini yenilemeyi desteklemektedir. Bu nedenle atmosferik oksijen seviyesinin altında proliferasyon miktarı ve pluripotent hücre sayısı artmaktadır¹³.

Embriyonik kök hücreler ve kanser hücreleri birkaç açıdan birbirine benzemektedir. Örneğin immun sistemi baskılanmış farelere verildiğinde her iki hücre tipi de malign ve benign tümör oluşturabilmektedir. Her iki hücre tipi de hızlı hücre döngüsüne sahiptir ve sonuçta hızlı bir proliferasyon gerçekleşmektedir. Her iki hücre tipinde telomeraz aktivitesi fazladır. Her iki hücre tipi ilaçların dışarı atılmasını sağlayan “side population cells” denen hücrelere sahiptir. Ayrıca çeşitli sinyal yolları da embriyonik kök hücrelerde kendini yenileme için kullanılırken kanser hücrelerinde ise büyüme için kullanılmaktadır (Şekil 2.7)¹⁴.



Şekil 2.7. Embriyonik kök hücre ve kanser hücrelerinin kullandığı ortak genler¹⁴.

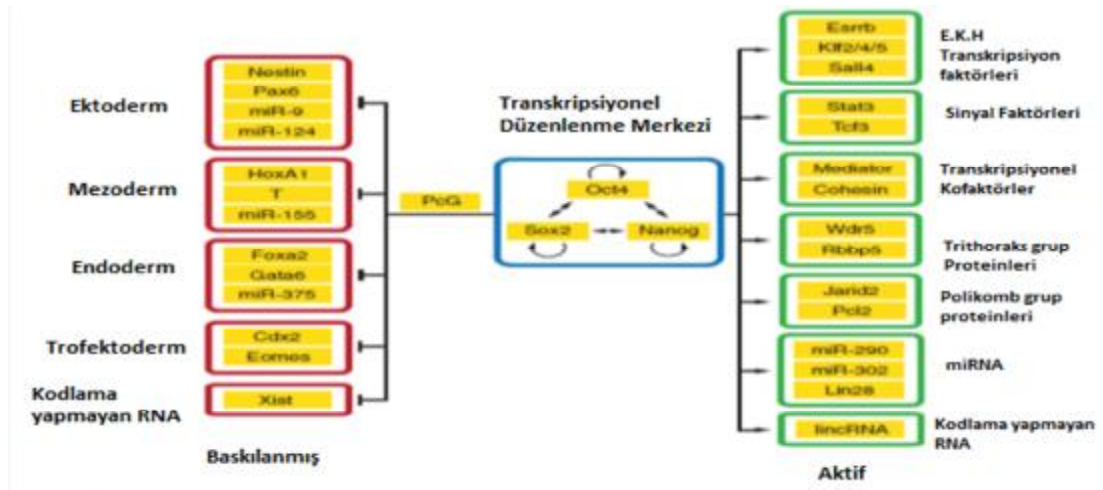
Kök hücre ve kanser hücreleri arasındaki benzerlikler her iki grubun da gen ekspresyonunun düzenlenmesinde benzerliklerin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca somatik hücrelerin yeniden programlanması, IPS hücreleri ve kanser hücreleri arasındaki benzerliği göstermektedir⁵¹.

Son yıllardaki araştırmalar tümör içindeki küçük bir hücre popülasyonunun tümörü başlattığı, tümörün devamlılığını sağladığı ve tedaviye karşı direnç oluşumuna neden olduğunu öne sürmektedir. Kanser kök hücreleri ya da tümör başlatıcı hücreler erişkin kök veya progenitor hücrelerden ya da somatik hücrelerin dediferansiyasyonundan köken almaktadır⁵¹.

Embriyonik kök hücrelerde, farklılaşmamış durum OCT4, SOX2 ve NANOG çekirdek transkripsiyon faktörleri ile devam ettirilir. Çalışmalar, bu kor transkripsiyon faktörlerinin birçok embriyonik kök hücre geninin promotor bölgesine birlikte bağlandığını göstermektedir¹⁵.

Homeodomain transkripsiyon faktörleri olan OCT4 ve NANOG erken embriyo gelişimi ve embriyonik kök hücrelerin pluripotensisinin devam ettirilmesi için gerekli olduğu saptanan ilk proteinlerdir. İnsan embriyonik kök hücrelerinde saptanan bir diğer protein HMG-box transkripsiyon faktörü olan SOX2'dir. SOX2'nin OCT4 ile heterodimer oluşturarak fare embriyonik kök hücrelerinde çeşitli genleri regüle ettiği bilinmektedir. OCT4, SOX2 ve NANOG hedef genlerinin büyük bir kısmı ortaktır¹². Kor transkripsiyon faktörleri, hem Polycomb grubu proteinlerin soyunun spesifik

transkripsiyon faktörlerini baskılarken, diğer pluripotensi faktörlerini aktive ederek, hem de kendilerinin veya birbirlerinin ekspresyonlarını aktive ederek pluripotensiye devam ettirir. Dolayısıyla oto-regülatuar ve ileri besleme (feed forward) ile OCT4, NANOG ve SOX2, embriyonik kök hücre transkripsiyonel ağını sürekli şekilde devam ettirmektedir (Şekil 2.8)^{12,15}.



Şekil 2.8. Çekirdek Transkripsiyon faktörleri¹⁵

2.8.2. SOX2

SOX ailesi transkripsiyon faktörleri gelişim ve kök hücre biyolojisinde önemlidir. 1990 yılında önemli bir araştırma sonucunda memeli testis belirleyici faktör ve Y kromozomu üzerindeki lokasyonuna itafen, Sry (Sex-determining region on the Y chromosome) olarak adlandırılan bir gen keşfedilmiştir. Sry, DNA'yı tanımaya ve bağlanmaya izin veren bir adet high-mobility group (HMG) bölgesi içermektedir. Sry'nin HMG domaini ile %50 ya da daha fazla amino asit benzerliği taşıyan HMG bölgesi içeren proteinlere SOX (Sry-related HMG box) denmektedir. Bu proteinin bilinen fonksiyonları arasında embriyonik gelişimin düzenlenmesi, kök hücre devamlılığı ve erişkin dokularda homeostasi gelmektedir⁽⁵¹⁾. 1994 yılında SOX ailesi üyelerinden SOX2 geni insanlarda tanımlanmıştır. SOX2 geni 3q26.2-q27 kromozomal bölgesinde bulunmaktadır, SOXB1 grubuna dahildir ve 317 amino asit kodlamaktadır.

SOX2, N-terminal, HMG ve transaktivasyon olarak 3 ana bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.9)⁵².



Şekil 2.9. SOX2 geninin yapısı⁵²

SOX2 araştırmaları, kök hücre devamlılığı, hücre soyunun kaderinin belirlenmesi ve somatik hücrelerin pluripotensiye dönebilmesi için gerekli faktör olması alanında yoğunlaşmasına rağmen, hastalıklarda SOX2 değişimlerinin gelişimsel anomalilere (SOX2 heterozigot mutasyonu AEG sendromuna neden olmaktadır) neden olduğu gösterilmiştir. Gelişimsel hastalıkların yanında yapılan araştırmalar SOX2'nin kanserle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bir hücrede genetik değişimler birikip, normal hücre döngüsünü modifiye ettiğinde kanser gelişimi meydana gelmektedir. Genetik değişimler, delesyon ve gen amplifikasyonlarını kapsamaktadır. Gen amplifikasyonu belirli bir kromozom bölgesinde kopya sayısı artışı olarak tanımlanmaktadır. SOX2 amplifikasyonu, 3q26.3 gen lokusunun çoğalmasıyla gerçekleşir ve glioblastom, küçük hücre akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde görülmektedir⁵².

Kanser; güçlenmiş proliferatif sinyal, invazyon ve metastaz aktivasyonu, ölümden kaçış gibi önemli özellikleri olan bir hastalıktır. SOX2'nin meme, prostat, pankreas ve serviks kanserlerinde hücre proliferasyonunu arttırdığı, prostat, mide ve küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde apoptotik sinyallerden kaçmayı sağladığı, melanoma, kolorektal, glioma, mide, yumurtalık ve karaciğer kanserlerinde invazyon, migrasyon ve metastazı arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 2.10)⁵³.

SOX2 ekspresyonu sonucunda tek bir transkript oluşsa da, SOX2 aktivitesi translasyonel ve post translasyonel modifikasyonlara göre çeşitlilik göstermektedir. Çeşitli çalışmalarda translasyonel seviyede miRNA'ların SOX2'yi inhibe ettiği gösterilmiştir⁽⁵³⁾. Yapılan çalışmalarda, farklı kanser türlerinde, mir-145, microRNA-

371-5p, mir-590-5p, mir-126, mir-9 gibi çeşitli miRNA'ların SOX2 ifadesini 3'-untransle bölgeye bağlanarak inhibe ettiği bildirilmiştir⁵⁴⁻⁵⁷.

Translasyonel düzenlenmenin yanında posttranslasyonel modifikasyonlar da SOX2 protein aktivitesini etkilemektedir. SOX2 317 amino asitten meydana gelmektedir ve birçok bölgesi fosforilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon, metilasyon ve sumolasyon (histon proteinine sumo= small ubiquitin-like modifier proteinin kovalent olarak bağlanmasıdır) ile modifiye olabilmekte, bu modifikasyonlar sayesinde SOX2 farklı aktiviteler gösterebilmektedir⁵⁷. Küçük ubiquitin ilişkili modifiye edici (SUMO) moleküller nükleer proteinleri modifiye ederek birlikte çalıştıkları moleküllerle olan interaksiyonlarını ve hücresel lokalizasyonlarını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda SOX2'nin lizin247 sumolanmasıyla, DNA'ya bağlanma özelliği değişebildiği gösterilmiştir⁵⁹. Başka bir çalışmada SOX2'nin DNA bağlanma bölgesinde bulunan nükleer çıkış sekansındaki (nuclear export signal) lizin 75 aminoasitinin asetillenmesinin, SOX2'nin nükleusdan dışarı çıkmasını düzenlediği saptanmıştır⁶⁰. Farklı bir çalışmada ise Akt'nin, treonin 118'den fosforilleyerek, SOX2'nin stabilitesini ve transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir⁶¹. Lizin metilasyonu katalitik SET domaini içeren metiltransferazlarla gerçekleştirilmektedir. Set7, SOX2'yi K119'dan monometiller ve SOX2 transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. E3 ligazı olan WWP2 K119'u metillenmiş SOX2 ile HECT domaini aracılığı ile interaksiyon verir, SOX2'nin ubiquitine olmasını ve degradasyonunu indükler⁶².

SOX2'nin kanser progresyonuna etkisini araştıran çalışmalarda, SOX2'nin çeşitli kanser tiplerinde ekspresyonunun arttığı bildirilmesine rağmen bu konuda çelişki sonuçlar mevcuttur. Farklı kanser tipleriyle yapılan çalışmalarda artmış SOX2 ekspresyonunun kemoterapi cevabında apoptoza direnç oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir⁶³. Mide kanserinde yapılan çalışmalarda ise çelişkili sonuçlar bulunmaktadır^{64,65}. Bazı çelişkili sonuçlara rağmen, genel olarak insan kanserlerinde SOX2'nin anti apoptotik bir faktör olduğu gösterilmiştir, ancak farklı kanser modellerinde SOX2 farklı hedef genleri etkilemektedir⁶². SOX2 susturularak küçük hücre dışı akciğer kanseri ile yapılan bir çalışmada, p53 aktivasyonu, TNF-a, Bax, Bad'ın artan ekspresyonu, mitokondriden sitozole sitokrom c salınımı, survivin ekspresyonunun azalması ve prokaspaz 3 ile 8'in kesimlenmesi ile içsel ve dışsal apoptotik yolların aktive olduğu gösterilmiştir⁶². Yapılan çalışmalarda, SOX2

ekspresyonunun ortadan kaldırıldığı durumlarda p21 ve p27'nin transkripsiyonel indüksiyonu aracılığı hücre büyümesinin inhibe olduğu, artan SOX2 ekspresyonunun siklin D3 transkripsiyonel indüksiyonu aracılığı ile hücre proliferasyonunu arttırdığı, SOX2'nin hücresel migrasyon ve invazyon üzerindeki etkisini, MMP-2 aracılığı ile gerçekleştirdiği saptanmıştır (Şekil 2.10)⁵¹.

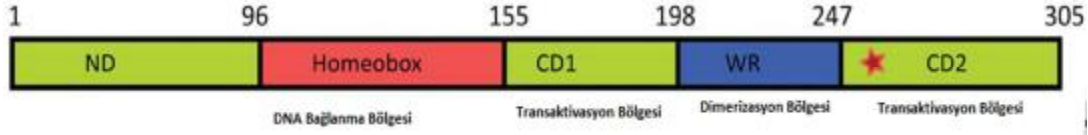


Şekil 2.10. SOX2 geninin kanserdeki rolü⁵⁸

2.8.3. NANOG

NANOG homeodomain-içeren transkripsiyon faktörüdür, POU-domaini içeren OCT4 ve HMG domaini içeren SOX2 ile birlikte farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde kendini yenileme ve pluripotensinin devam ettirilmesinde önemlidir. İnsan Nanog proteini 305 amino asitten meydana gelir, N-terminal, homeobox ve C terminal olarak 3 bölgeye ayrılır. N terminal bölge, serin, treonin, prolince zengindir ve transkripsiyonel aktivite için yapısal motif sağlar, C-terminal bölge, 2 transaktivasyon altdomaini içermektedir. Merkez bölgedeki Homeobox domain ise DNA-bağlanma motifine sahiptir. Homeobox domainin N ve C uçları nükleer lokalizasyon sekanslarına sahiptir, orta bölgesinde ise nükleer eksport sinyali vardır, bu şekilde Nanog proteini nükleus ve stoplazma arasında hareket eder. Nanog aynı zamanda somatik fibroblastları, İPS (induced pluripotent stem cells) denen embriyonik hücre benzeri pluripotent

hücrelere yeniden programlayan transkripsiyon faktörlerinden biridir⁶⁶. Nanog 12p13.31 kromozomal bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 2.11)⁶⁷.



Şekil 2.11. NANOG geninin yapısı⁶⁸

Nanog ekspresyonu OCT4/SOX2 heterodimeri ile düzenlenmektedir. OCT4/SOX2, Nanog proximal promotor bölgesinde octomer/Sox elemanına bağlanır ve Nanog transkripsiyonu indüklenir. Embriyonik kök hücrelerde NANOG, OCT4, SOX2, Lin28 gibi transkripsiyonel faktörlerle birlikte pluripotensi ve farklılaşma arasındaki dengeyi sağlar. Kanser hücrelerinde, özellikle malign, high grade ve zayıf farklılaşmış olanlarda NANOG genelde fazla miktarda eksprese olur. Anormal ya da bozulmuş NANOG ekspresyonu hücreyi yeniden programla benzeri sürece sokar ancak hücreleri kök hücre durumunda tutamaz ve hücrede tümör oluşumuna neden olan çeşitli sinyallerin artmasıyla sonuçlanır⁶⁶.

Embriyonik kök hücre düzenlenme yolağında görevli OCT4 ve SOX2 dışında, mikroRNAlar, transkripsiyon faktörleri ve kinazlar gibi farklı regülatörler de NANOG ekspresyonunun baskılanması ya da artmasıyla ilgilidir. Dolayısıyla bu regülatörler kök hücre durumunun devam ettirilmesi ve malign transformasyonun oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Şekil 2.12).

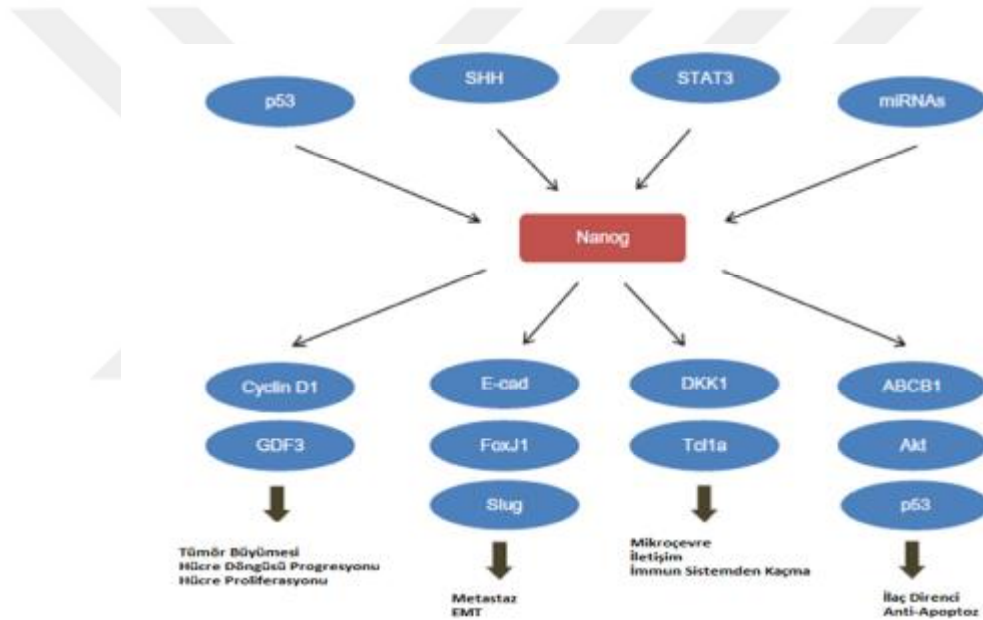
- p53 stresin aktive ettiği bir transkripsiyon faktörüdür ve genetik olarak hasarlı hücrelerde proliferasyonu engeller. P53 apoptoz ve hücre döngüsü yollarında anahtar molekülerden biridir. Hücre döngüsü kontrol noktası aktive olduğunda hücreyi senesense yönlendirir ve tümör baskılanmasında önemli role sahiptir. Fare ES hücreleri ile yapılan çalışmalarda p53'ün NANOG promotorundaki p53 bağlanma motifine bağlandığı ve DNA hasarına cevapta NANOG transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir. NANOG'un baskılanması aracılığı ile farklılaşmanın indüklenmesinde, p53 EK hücrelerinde genetik stabiliteyi

sağlar. P53- NANOG regülatuar yolağı özellikle beyin CSC’de görülmektedir. NANOG, p53-hasarlı olgun fare astrositlerinde CSC-benzeri fenotipi indüklerken, p53 hasarı olmayan astrositlerde bu etkiye sahip değildir. Ayrıca çalışmalar İPS hücrelerinin oluşturulmasında p53 baskılanmasının gerekli olduğunu, p53-p21 yolağının İPS ve tümör oluşumu açısından engel oluşturduğunu göstermektedir⁶⁶.

- Nanog ve Hedgehog embriyonik gelişimin erken safhalarında ve kanserde ES’lerin kendini yenilemesinin desteklenmesinde gerekli regülatörlerdir. Hedgehog aktivitesinin downstream efektörleri olan Gli1 ve GLI ailesi çinko parmak 2, fare ve insan nöral kök hücrelerinde NANOG’un cis-regülatör sekansına bağlanmakta ve NANOG transkripsiyonunu aktive etmektedir⁶⁶.
- STAT3 embriyonik kök hücrelerin pluripotensisi için gerekli olan LIF yolağının ana efektörüdür. Bazı çalışmalar fare embriyonik kök hücrelerinde farklılaşmama durumunun devam ettirilmesinde STAT3 ve Nanog’un birlikte çalıştığını göstermekte, bazı çalışmalar ise LIF’in indüklediği STAT3 fosforilasyonunun, STAT3’ün Nanog geninin enhancer dizilerine bağlanmasını sağladığı bu şekilde embriyonik kök hücrelerde NANOG ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir⁶⁶.
- Kanser hücrelerinde Nanog artmış ekspresyonunun in vitroda proliferasyon ve in vivo da tümör büyümesiyle ilişkili olduğu saptanmıştır. NANOG knockdown çalışmalarında siklin D1, D2, D3 ve E1 ile siklin bağımlı kinaz1 ve 6’nın ve p53-ilişkili sinyal yolağında bazı genlerin ekspresyonlarının azaldığı saptanmış dolayısı ile NANOG’un hücre döngüsü ve canlılığında rolü olduğu düşünülmektedir⁶⁶.
- Çeşitli kanser tiplerinde NANOG’un artan ekspresyonunun tümör metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yumurtalık kanseri hücre serilerinde NANOG ekspresyonunun knockdown edilmesiyle FOXO1, FOXO3a, FOXJ1 ve FOXB1 mRNA seviyelerinin arttığı, NANOG’un ektopik artan ekspresyonu ile bu genlerin ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Dolayısı ile NANOG aracılı hücre migrasyon ve invazyonu FOXJ1 ve E-caderin ile ilişkilidir. NANOG ve OCT4’ün birlikte ekspresyonunun akciğer adenokarsinomu hücrelerinde Slug ekspresyonunu arttırarak hücre motilitesine ve tümör metastazına neden olduğu

saptanmıştır. NANOG'un tek başına da epitelyal mezenşimal transisyonda ve tümör invazyonunda önemli olan Slug transkripsiyonunu arttırdığı belirtilmektedir⁶⁶.

Kanser kök hücrelerinin kemoterapi direncinin OCT4 ve NANOG gibi faktörlerin ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Akciğer adenokarsinom hücreleri ile yapılan çalışmalarda NANOG ve OCT4'ün ektopik olarak ekspresyonunun artması ABCB1 gen ekspresyonunu arttırmakta bu durum da akciğer adenokarsinom hücrelerini cisplatine yüksek toleranslı hale getirmektedir (Şekil 2.12)⁶⁶.



Şekil 2.12. NANOG geninin kanser sinyal yollarındaki rolü⁶⁶.

2.8.4. OCT4

Memeli embriogenezi sırasında, embriyonik hücreler pluripotent durumdan farklılaşarak, farklı hücre soylarına dönüşmekte, böylece gelişimsel potansiyellerini kaybetmektedirler. Pluripotensi, preimplante embriyonun iç hücre kitlesindeki hücrelerinin karakteristik özelliğidir ve bir hücrenin organizmadaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğini tanımlamaktadır. Pluripotensi büyük bir transkripsiyonel ağ tarafından kontrol edilmekte ve ayrıca farklılaşmış somatik hücreler çeşitli

transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak pluripotent bir duruma yeniden programlanabilmektedir⁶⁹.

OCT3/4 proteini, 3 farklı grup tarafından izole edilmiştir. OCT1 ve OCT2 daha önce tanımlandığından, iki grup izole edilen yeni proteine OCT3, diğer grup ise OCT4 adını vermiş, protein oct3/4 olarak tanımlanmıştır. OCT3/4 transkripsiyon faktörü POU ailesine dahildir ve 6p21.31 kromozom bölgesindeki *POU5F1* geni tarafından kodlanmaktadır. Proteinin N-terminal, POU (Pit-Oct-Unc) ve C terminal olarak 3 domaini vardır. N ve C terminal bölgeler transaktivasyon, POU domain ise, POU spesifik bölge ve POU homeodomain olarak iki parçalı DNA bağlanma bölgesi içermektedir (Şekil 2.13)^{14,70}.

İnsanlarda OCT4, *OTF3* geninin ürünüdür, OCT4A, OCT4B ve OCT4B1 olarak 3 ürünü vardır. Bu izoformlar arasında sadece, fare OCT4 ile %87 oranında amino asit sekans homolojisi gösteren OCT4A izoformu pluripotent kök hücrelerde “stemness” özelliğinin devamından sorumludur⁶⁹.

Octomer-binding transkripsiyon faktörü 4 (OCT-4), Pit-Oct-Unc (POU) ailesinin homeodomain içeren ve pluripotent kök hücrelerin kendini yenilemesi ve pluritensisinden sorumlu en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir. OCT4 proteinleri, alternatif splicing ve alternatif translasyon başlaması ile 3 ayrı transkript (OCT4A, OCT4B ve OCT4B1) ve 4 protein izoformu (OCT4A, OCT4B-190, OCT4B-265 ve OCT4B-164) oluşturabilen *POU5F1* geni tarafından kodlanır. İnsan OCT4A (genellikle OCT4 olarak adlandırılır) 360 aminoasit içerir. Bu protein OCT4A’ya özgü 137 amino asitlik bir N-transaktivasyon domaini, 152 amino asitlik POU domaini ve 71 aminoasitlik bir C-transktivasyon domaini içermektedir. POU domaini, birbirlerine 17 amino asit ile bağlanan NH₂-terminal ucunda 75 amino asitlik bir POU_S ve COOH-terminal ucunda 60 amino asitlik bir POU_H olarak adlandırılan yapısal olarak bağımsız iki DNA bağlanma domaini içermektedir (Şekil 2.13)^{70,71}.



Şekil 2.13. OCT4 geninin yapısı⁷¹.

POU_S ve POU_H domainleri, hedef genlerin promoter ya da enhancer bölgelerine karakteristik oktomer motifine (ATGC/TAAT) yarı yarıya bağımsız ve esnek şekilde bağlanır. Bu esneklik OCT4'ün diğer transkripsiyon faktörleri ile heterodimer oluşturmaya izin verir⁷¹.

Fare gelişimde OCT4 faktörün eksikliği iç hücre kitlesinin kaybına neden olmaktadır. OCT4'ün knock out yapıldığı embrionik kök hücreler trophektoderm hücrelerine farklılaşmaktadır, dolayısıyla OCT4'ün ES'lerin kendini yenilemesinde önemli olduğu anlaşılmaktadır. Son çalışmalar, OCT4'ün IPS hücrelerinin oluşturulabilmesi için gerekli faktörlerden olduğunu göstermektedir¹⁴.

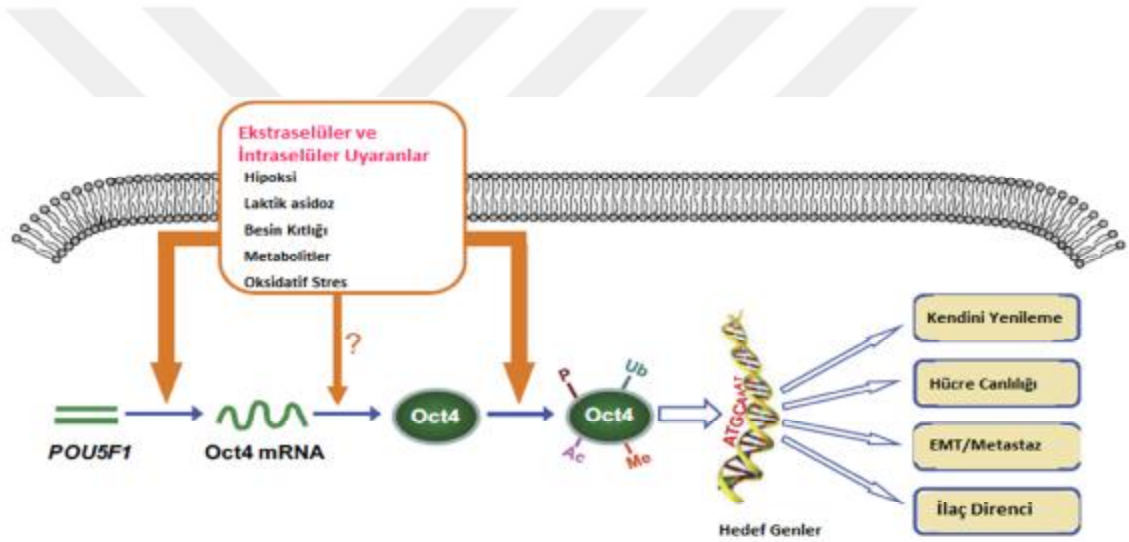
Embryonik kök hücre kimliğinin devam edebilmesi için OCT4 ekspresyonu sıkı şekilde denetlenmektedir. OCT4 ekspresyonundaki değişimler farklılaşmayı tetikler, ektodermal, endodermal, mezodermal ve primitif progenitörlere özelleşmeye yol açar. OCT4'ün doza bağımlı olarak tümör büyümesini arttırdığı ve farklı insan tümörlerinde eksprese olduğu gösterilmiştir⁷³.

Hücrede OCT4 ekspresyonunun kontrolü çeşitli yollarla gerçekleşir. OCT4 ekspresyonu için kromatin durumu önemlidir. Farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde, OCT4 lokusu hipometile durumdadır, farklılaşmanın indüklenmesi ile OCT4 ekspresyonunun baskılanması için çeşitli epigenetik modifikasyonlar gerçekleşir. Transkripsiyonel seviyede kontrolde ise OCT4 lokusuna bağlanan trans acting regülatörler önemli rol oynamaktadır. Ayrıca pluripotensi faktörleri otoregülatör ve geri bildirim döngüleri ile de OCT4 ekspresyonunu düzenler. Bunun dışında çeşitli miRNA'ların da OCT4 ekspresyonunun post transkripsiyonel düzenlenmesinde rolü vardır⁶⁹.

Erişkin insan dokularında OCT4 ekspresyonu germ hücreleriyle sınırlıdır diğer dokularda çok düşük miktarda bulunmaktadır. Buna karşın prostat, meme, oral, mesane ve seminoma gibi bazı insan kanserlerinde eksprese olduğu gösterilmiş, dolayısı ile kanser gelişiminde önemli bir transkripsiyon faktörü olabileceği düşünülmüştür. OCT4'ün meme, akciğer ve kemik sarkomunda kök hücre benzeri hücrelerde yüksek miktarda eksprese edildiği, ayrıca nazofarengeal karsinomlu hastalarda ekspresyonunun arttığı ve düşük sağ kalımla korelasyon gösterdiği saptanmıştır¹⁴.

Yapılan çalışmalarda OCT4'ün direk ya da indirek olarak apoptoz inhibitörü olan Survivin ekspresyonunu düzenlediği⁷⁴, OCT4'ün susturulmasının, TGF-B ailesi

genleri olan ELF, Smad3, Smad4 ve WNT/b-catenin ailesi üyeleri wnt10b ve B-catenin ekspresyonlarını azalttığı⁷⁵, WNT sinyal yolağı Lenfoid Enhancer Faktör 1 (LEF1) ve Twist ailesi BHLH transkripsiyon faktör 1'in OCT4 tarafından artırıldığı, kaderin 2'nin ise azaldığı saptanmıştır. Sonuçta da OCT4'ün LEF1'i düzenleyerek LEF1/B-catenin bağımlı WNT sinyal yolağını ve epitelyal mezenşimal transisyonu arttırdığı belirtilmiştir⁷⁶. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda OCT4'ün AKT yolağı aracılığı ile hücre canlılığını arttırdığı, mezenşimal markerları artırıp, epitelyal markerları azaltarak epitelyal mezenşimal transisyonu tetiklediği, antiapoptotik proteinler ve ilaç direnci ilişkili genlerle pozitif korelasyon göstermesinin de ilaç direncine neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.14)⁷¹.



Şekil 2.14. OCT4 geninin kanserde düzenlenmesi ve rolü⁷¹.

2.9. CD133

CD133 insan hematopoietik kök hücre ve fare nöroepitelyal hücrelerinde saptanmış pentaspan membran proteinidir. Birçok çalışma bu proteinin ekspresyonunun, progenitör/kök hücre, tümör, rejenerasyon, farklılaşma ve metabolizma ile ilgili olduğunu ileri sürmektedir. CD133 kök hücrelerden izole edilen anahtar biomarkerlardan biridir, ancak son çalışmalar sadece biomarker olarak değil, hücre büyümesi, gelişim ve tümör biyolojisinde de görevli olduğunu göstermektedir⁷⁷.

Prominin-1 olarak da adlandırılan CD133, insanda 4. kromozomda (4p15.33) bulunan tek kopya bir genin ürünüdür. İnsan CD133 865 amino asitlik, 120kDa'luk bir transmembran proteinidir. Protein, bir N-terminal ekstrasellüler domain, iki büyük ekstrasellüler döngüsü olan 5 transmembran domain ve 59 amino asitlik stoplazmik kuyruktan oluşmaktadır⁷⁷.

CD133 ekspresyonu birçok ekstrasellüler ve intrasellüler faktör tarafından düzenlenmektedir. Hipoksi, mitokondriyal fonksiyon bozulukluğunun, CD133 ekspresyonunu geri döndürülebilir şekilde arttırabildiği çalışmalarda gösterilmiştir. Hipoksinin indüklediği CD133 ekspresyonu akciğer, pankreas kanserleri ve glioma hücrelerinde saptanmıştır. Artan HIF-1 α 'nın CD133⁺ hücreleri çoğalttığı belirtilmektedir. Farmakolojik olarak mTOR inhibisyonunun CD133⁺ hücre popülasyonunu ve kök hücre benzeri genlerin ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir⁷⁷.

Farklı kanser hücre serilerinde yapılan çalışmalarda CD133⁺ hücre popülasyonunda Akt, MAPK, Ras, ERK, JNK, PI3K, p38K ve RalA yolaklarının aktive olduğu saptanmıştır. Akciğer kanseri hücre serilerinde OCT4 ve/veya SOX2 transkripsiyon faktörlerinin CD133 P1 promotor dizisine bağlandığı ve ekspresyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Buradan yola çıkarak da CD133 ekspresyonunun belirli hücre tiplerinde kendini yenileme ve tümör oluşumunda gerekli olduğunu göstermektedir⁷⁷.

Erken evre karaciğer metastazı yapan kolorektal kanserlerde CD133 ve CD44 ekspresyonunun erken metastaz yapmayanlara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Hepatokarsinom hücre serilerinde CD133'ün knock down edilmesinin matriks metalloproteinaz-2, disintegrin ve metalloproteinaz 9 ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır⁷⁷.

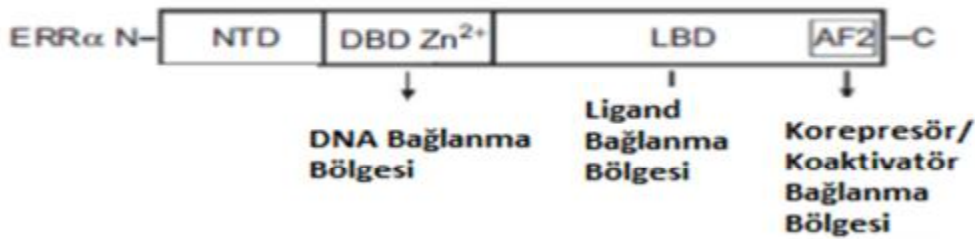
CD133⁺ hücrelerde kemoterapi direnci yüksektir. Bu hücrelerde ATP-binding cassette transporter ekspresyonu artmaktadır. Bu hücreler aynı zamanda TGF B ve TNF-ilişkili apoptoz ve TRAIL'in indüklediği apoptoza da dirençlidir⁷⁷.

2.10. ESRRA

Çok hücreli organizmalarda hücresel fonksiyonlar genlerin kontrolü altındadır. Hücresel fonksiyonları yöneten genlerin ekspresyonu, organizmanın homeostazını optimal seviyede tutmak için doku/hücre spesifik transkripsiyon faktörler ile kontrol altında tutulmaktadır. Nüklear reseptörler (NR), çeşitli fonksiyonlarla ilgili genleri

düzenleyen transkripsiyon faktör ailesidir. NR'ler insanda 48, farelerde 49 farklı reseptöre sahip bir süper ailedir. Bu ailenin birçok üyesi hormon/ligand'ın aktive ettiği reseptörlerdir, ancak insanlarda 48 reseptörün 24'ünün doğal endojen ligandı saptanmamıştır. Dolayısıyla bu reseptörlere öksüz (orphan) NR'ler denmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda ONR'lerden bazılarının endojen ligandı saptanmış ve bunlar evlatlık (adopted) NR adını almıştır⁷⁸.

Orphan NR'lerin önemli bir ailesi NR3B alt ailesi olarak da adlandırılan estrogen related reseptörlerdir (ERR). Bu ailenin estrogen related olarak adlandırılmasının sebebi ER α ile yüksek sekans homolojisi göstermesi ve hormon olmayan sinyallerle aktive olabilmesidir. ER α ile yakın homoloji göstermesine rağmen, ERR'ler östrojen ya da doğal agonistlerine bağlanmaz. ERR α hem represör hem de aktivatör olarak fonksiyon gösterir ve diğer ONR'ler içinde en iyi bilinen ve anlaşılmış olandır. ERR α polipeptidinin, N-terminal domain (NTD), DNA bağlanma domaini (DBD) ve ligand bağlanma domaini (LBD) olarak 3 fonksiyonel domaini bulunmaktadır. NTD; en az korunmuş olan ve posttranslasyonel kovalent modifikasyonların olduğu bölgedir. DBD; 2 çinko parmak motifi içerir ve ERR α 'nın DNA üzerinde hedef genin regülatör bölgesindeki spesifik sekansı tanımasını ve bağlanmasını sağlar. Yüksek oranda korunmuş LBD; ligand bağlanma cebi içerir ve reseptör dimerizasyon bölgesidir. LBD'nde bulunan AF2 bölgesi koaktivatör ve korepresörlerle fonksiyonel interaksiyon verilen bölgedir. ERR α , DNA'da konsensus sekansı TNAAGGTCA olan estrogen related response elemanlara (ERRE) bağlanır. ERR α 'nın fizyolojik ligandı bilinmediğinden basal aktivite ile konstitütif olarak aktif olduğu düşünülmektedir, ancak optimal gen regülasyonu, PGC-1 α veya PGC-1 β ve RIP140 ile fonksiyonel interaksiyona bağlıdır (Şekil 2.15)⁷⁸.



Şekil 2.15. ESRRA geninin yapısı⁷⁸

Estrogen related receptor alpha 11q13.1 gen bölgesinde bulunmakta ve 13.5 kb'lık genomik DNA'yı kapsamaktadır. Genin 7 ekzonu vardır ve 423 amino asit uzunluğunda 46kDA'luk protein kodlamaktadır, böbrek, kalp ve iskelet kası gibi enerji gereksinimi fazla olan dokularda yüksek miktarda ekprese olmaktadır. Transkripsiyon faktörü olarak, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu ile ilişkili OPN (osteopontin) ve WNT11 (wingless-type MMTV integration site family member 11) genlerini pozitif olarak düzenlemektedir. ESRRA proteini estrogen reseptor α ile yüksek derecede benzerlik göstermekte, hem östrojen cevap elementine (5'-TCAAGGTCA-3') hem de kendi cevap elementine (5'-GGTCANNNTGACC-3') bağlanabilmektedir⁷⁹.

Hızlı şekilde büyüyen solid tümörler düşük oksijen seviyesine sahip bölgelerde oksijen ve besin takviyesini kan damarları aracılığı ile sağlar. Kanseri hücreleri bu hipoksik çevreye uyum sağlamak için adaptasyon geliştirir. Kanseri hücreleri enerji ihtiyaçları sıklıkla glikolizle sağlanmaktadır. Glikolizde glukoz prüvata parçalanır. Prüvat daha sonra laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi ile laktik aside ya da oksijen varlığında, prüvat dehidrojenaz (PDH) ile asil co-A'ya oksidize olur. Bu aşama hücresel enerji metabolizmasında önemli bir aşamadır. Çünkü PDH, prüvat dehidrojenaz kinazlar (PDK) tarafından kontrol edilmektedir. Asetil co-A daha sonra krebs döngüsüne girip oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi gerçekleşir. Hipoksi durumunda, oksidatif fosforilasyon için gereken substrat olan oksijen yokluğunda, hücreleri ATP üretimi için mitokondriyal solunum yolağını kullanamaz. Tümör hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamak için hipoksinin indüklediği faktörler (HIF), glukoz alımını ve anaerobik glikolitik ATP üretimini arttırmak için glukoz transporter ve glikolitik enzimleri (LDH) kodlayan genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır. Ayrıca HIF, PDK1 ile interaksiyon vererek krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyonu azaltarak tümör hücrelerinin hipoksik çevrede hayatta kalmasına ve büyümesine izin vermektedir⁸⁰.

Tümör hipoksisi ve HIF'in artan ekspresyonu agresif tümör davranışına, azalan tedavi yanıtına ve sporadik kanserlerin büyük kısmında artan hasta mortalitesine neden olmaktadır. Genetik ve farmakolojik olarak HIF aktivitesinin deneysel olarak azaltılması ksenograft ve transgenic modellerde tümör boyutunun azalmasını sağlamaktadır. Bu çalışmalar HIF'in tümör büyümesi ve progresyonunda rolü olduğunu göstermektedir. Solid tümörlerin büyük kısmında hipoksinin görülmesi ve HIF

yolağında merkezde yer almasından dolayı HIF inhibisyonu tedavide dikkat çekmektedir⁸⁰.

Nükleer reseptörler dışındaki transkripsiyon faktörleri, enzimler gibi aktif bölgelerine özgü inhibitör saptanmasının olası olmamasından dolayı ilaç tasarımına uygun hedefler değildir. ERR'ler HIF aracılı hipoksik cevapta önemli kofaktör olarak tanımlanmıştır. ERR'ler fonksiyonel HIF heterodimerlerini tanımaktadır. HIF'lerin ilaçla bloke edilmesi zor olmasından dolayı, ERR inhibisyonu ile hipoksinin indüklediği gen ekspresyonu ve malign fenotip ortadan kaldırılabilirliği düşünülmektedir⁸⁰.

XCT790 ERRa'nın spesifik invers agonistidir. XCT790 seçicidir, 10 μ M'ın altındaki konsantrasyonlarda ERR γ veya ER α gibi nükleer reseptörler üzerinde antagositik etki göstermez. XCT790'nın biyokimyasal ve hücre tabanlı çalışmalarda ERRa'nın konstitütif aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir⁸¹.

Bu çalışmada; larinks kanseri hastalarında hipoksinin indüklediği faktörler olan HIF-1 α ve HIF-2 α ile embriyonik kök hücre genleri olan SOX2, OCT4, NANOG ile CD133, ESRRA genlerinin ekspresyon düzeyini saptamak ve hastalığın klinik özellikleriyle olası ilişkilerini ortaya çıkarmak ayrıca Hep2 larinks kanseri ve FaDu farenks kanseri hücre serilerinde hipoksinin HIF-1 α , HIF-2 α SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA genleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Eldesi

Larinks skuamöz hücreli karsinom teşhisi konulmuş ve gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul ederek onam formu imzalayan 26 hasta çalışmaya dahil edildi ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Raporu alınarak çalışmalar yapıldı. Tanısı konulan bireylerden total larenjektomi sonrasında alınan skuamöz hücreli Larinks kanseri tümör doku örnekleri ve tümöre komşu sağlıklı larinks doku örnekleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda dokuların patolojik incelemesi yapılarak skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulandı.

3.1.2. Hep-2 Hücrelerin Temini

Hipokisinin etkisinin belirlenmesi deneyinde kullanılmak üzere, Hep-2 hücre hattı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü'nden temin edildi.

3.1.3. FaDu Hücrelerinin Temini

Hipokisinin etkisinin belirlenmesi deneyinde kullanılmak üzere, FaDu hücre hattı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi.

3.1.4. Gereç ve Cihazlar

3.1.4.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Yapılan araştırmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nün sahip olduğu olanaklardan faydalanıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Ekipman ve Sarf Malzemeler

Adı/Modeli	Kullanım Amacı
Isı döngü cihazı / Thermal Cycler	cDNA sentezi
Gerçek-Zamanlı PZR	Gen ekspresyonlarının belirlenmesi
Elektroforez aletleri, güç kaynakları	RNA kalitesinin tespiti
Vortex	RNA izolasyonu
Laminar güvenlik kabini	Hücre kültür çalışmaları
Derin dondurucu -20	Analizlerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması
Derin dondurucu -80	Analizlerde kullanılacak RNA örneklerinin saklanması
Kit saklama dolabı +4 °C	Analizlerde kullanılacak reaktif ve solüsyonların saklanması
Spektrofotometre	RNA örneklerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi
Soğutmalı Mikrosantrifüj	RNA izolasyonu
Otoklav	Kullanılacak malzeme ve solüsyonların sterilizasyonu
T25, T75 flask	Hücre kültürü çalışmaları için
well plate	Hücre kültürü çalışmaları için
Hücre kazıyıcı	Hücre kültürü çalışmaları için

3.1.4.2. Gerekli solüsyonlar ve malzemeler

· Hücre Kültürü için gerekli solüsyonlar

- Ø DMEM (Lonza, Verviers, Belçika)
- Ø Trypsin (0.05 % Trypsin/0.53 mM EDTA, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- Ø Fetal Bovine Serum (FBS) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- Ø Penisilin-Streptomisin (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- Ø L-Glutamine (L-Glu) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)

- Ø Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)

- **RNA İzolasyon için gerekli solüsyonlar**

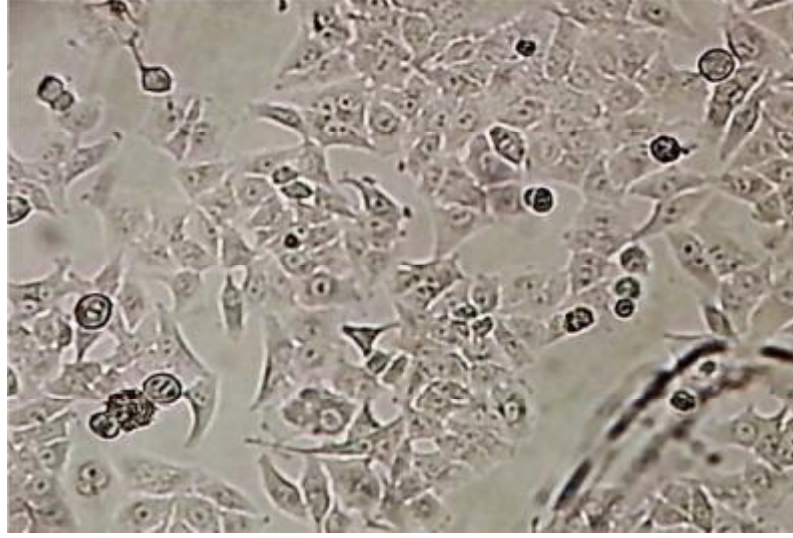
- Ø TRIzol (Sigma, ABD)
- Ø Kloroform (Sigma-Aldrich, ABD)
- Ø İzopropanol (Sigma-Aldrich, ABD)
- Ø Etanol (Merck, Darmstadt, Almanya)

- **cDNA Sentez Kiti** (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit - Thermo Fisher Scientific)
- **Eş Zamanlı PZR** (Applied Biosystems® 7500 fast and 7500 Real-Time PCR System)

3.2. Yöntem

3.2.1. Hep-2 Hücre Kültürü

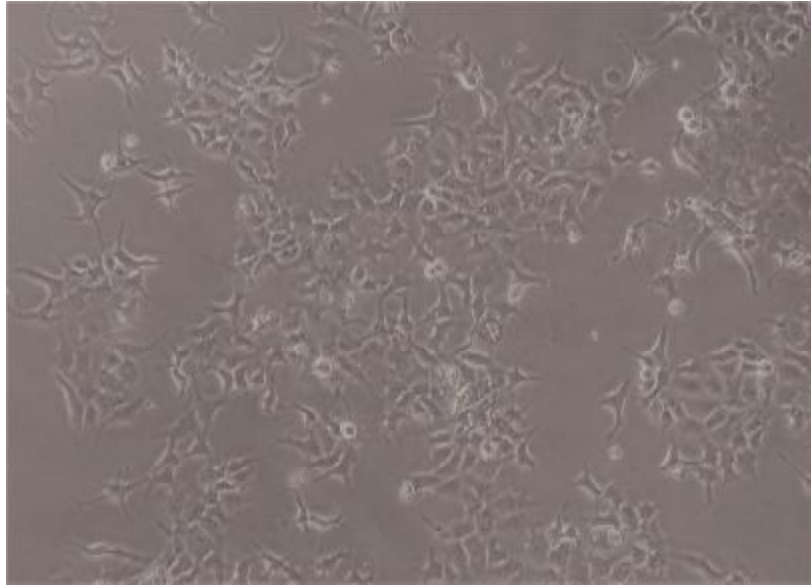
Temin edilen Hep-2 hücreleri %1 PS, %10 FBS ve %1 L-Glu DMEM besi yeri içerisinde ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C’de kültür edilerek çoğaltıldı. Yeterince pasajlama yapılarak çoğaltılan hücreler %10 DMSO içeren FBS solüsyonunda -80°C’de saklanmak üzere stoklandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Hep-2 hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü (×40)

3.2.2. FaDu Hücre Kültürü

Temin edilen FaDu hücreleri %1 PS, %10 FBS ve %1 L-Glu DMEM besi yeri içerisinde ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C’de kültür edilerek çoğaltıldı. Yeterince pasajlama yapılarak çoğaltılan hücreler %10 DMSO içeren FBS solüsyonunda -80°C’de saklanmak üzere stoklandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. FaDu hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü (×10)

3.2.3. Hücre Çözülmesi ve Pasajlanması

Ø Hücre Çözülmesi

- Hücreler dondurma vasatı (%10 DMSO-FBS) içersinde -80'de saklanmaktadır.
- Stok hücre çözüldükten sonra içinde 5 ml kültür medyumunu bulunan santrifüj tüpüne konur.
- Pipetaj yapılarak hücre ile kültür vasatının karışması sağlanır.
- Hücreler 1000 rpm' de 5 dk santrifüj edilir.
- Santrifüj tüpünün içindeki süpernatant pipetle atılır.
- Santrifüj tüpünün içine 1 ml medyum konulup pipetaj yapılır ve hücreler flask içine aktarılır.

Ø Hücre pasajlanması

- Hücreler CO₂ inkübatöründen alınır ve mikroskopta incelenir.
- Hücre tabakasının değmeyecek şekilde pipet yardımı ile medyum flasktan uzaklaştırılır.
- Flaska PBS eklenir, yüzey yıkanır ve PBS pipet yardımı ile uzaklaştırılır.
- Flaska Tripsin eklenir ve flask 2-3 dakika CO₂ inkübatöründe tutulur.
- Mikroskopta hücrelerin flask tabanından kalktığı kontrol edilir.
- Flaska medyum eklenir ve santrifüj tüpüne aktarılır.
- Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Supernatant 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırılır.
- Hücre pelleti medyum pipet ile karıştırılır.
- Hücreler içinde taze medyum bulunan flaslara aktarılır.
- Flasklar CO₂ inkübatörüne yerleştirilir

3.2.4. Hipoksi Muamelesi

Hücrelerin hipoksi muamelesinde Anaerogen compact sistemi (Anaero Gen Compaq AN0010C, Oxoid, Cambridge, UK) kullanıldı. Hücreler Thoma lamında sayılarak her plate'e 100.000 hücre gelecek şekilde önce ekilip kültürleri yapılarak %75 confluenceye (yoğunluğa) ulaşması beklendi. Her plate, hipoksiyi tetikleyecek bir torba ile birlikte üretici firma tarafından sağlanan plastik poşetlere konarak ağzı hızlıca kapatıldı. Hücreler 37 °C %5 CO₂ inkübatörde 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde

hipoksiye maruz bırakıldı. Hipoksiye maruz bırakılmayan kontrol grubu hücreleri 37 °C %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. Test iki kez tekrarlandı. İnkübasyon sonrası real time PCR için hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

3.2.5. XCT790 muamelesi

Hep-2 hücreleri 72 saat ve FaDu hücreleri 48 saatlik sürelerde hipoksik koşullarda 5µM, 10µM ve 20µM'lik XCT790 konsantrasyonalarına maruz bırakıldı. Test iki kez tekrarlandı. İnkübasyon sonrası real time PCR için hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

3.2.6. Dokudan RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu TRI Reagent kullanılarak yapılmıştır.

- 50-100 µg doku örneği buz üzerinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmış, üzerine 1ml Tri Reagent solüsyonu eklenerek ependorfa aktarılmıştır.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra örnek üzerine 200µl kloroform eklenmiş ve vorteks üzerinde 15 saniye karışması sağlanmış ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örnek +4°C'de 13500rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ependorfta 3 faz gözlenmiş, en üstte saydam olarak görülen RNA yeni bir ependorfa aktarılmıştır.
- RNA üzerinde 500µl isopropanol eklenmiş, 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 10 dakikalık inkübasyon sonunda örnek +4°C'de 13500rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası RNA, pelet halinde ependorfun duvarında görülmektedir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak RNA peleti %75 Etanol-DEPC su eklenerek, vorteks yapılmıştır, daha sonra +4°C'de 13500rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında supernatant uzaklaştırılarak RNA 5-10 dakika kurumaya bırakılmıştır.
- Süre sonunda pelet miktarına göre DEPC'li su eklenerek, örnek -80'ne kaldırılmıştır.

3.2.7. Hücre Serisinden RNA İzolasyonu

- Platette bulunan hücrelerden ilk olarak medyum uzaklaştırılır.
- Hücrelerin üzerine 500µl Tri Reagent eklenir ve hücrelerin plateden ayrılması sağlanır. Pipet yardımıyla lizat homojenize edilir.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra örnek üzerine 200µl kloroform eklenmiş ve vorteks üzerinde 15 saniye karışması sağlanmış ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda örnek +4°C 'de 13500rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ependorfta 3 faz gözlenmiş, en üstte saydam olarak görülen RNA yeni bir ependorfa aktarılmıştır.
- RNA üzerinde 500µl isopropanol eklenmiş, 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- 10 dakikalık inkübasyon sonunda örnek +4°C 'de 13500rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrası RNA, pelet halinde ependorfun duvarında görülmektedir.
- Süpernatant uzaklaştırılarak RNA peleti %75 Etanol-DEPC su eklenerek, vorteks yapılmıştır, daha sonra +4°C 'de 13500rpm 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında supernatant uzaklaştırılarak RNA 5-10 dakika kurumaya bırakılmıştır.
- Süre sonunda pelet miktarına göre DEPC'li su eklenerek, örnek -80'ne kaldırılmıştır.

3.2.8. RNA Kantitasyonu

RNA miktarının ölçümü Implen marka Nano fotometre yardımıyla yapılmıştır.

3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA izolasyonu için The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak total 1µg RNA'dan kantitatif RT-PZR için standart prosedür uygulanarak cDNA sentezi yapıldı. Revers transkripsiyon (RT) kit bileşenleri buz üzerinde çözündürüldükten sonra RT master mixi yine buz üzerinde hazırlandı (Çizelge 3.2). cDNA revers transkripsiyon reaksiyonunu

hazırlamak cDNA reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için Çizelge 3.3’de belirtilen program kullanıldı.

Çizelge 3.2. RT Master Mix Hazırlama

2x RT Master Mix	Kullanılan miktar
10X RT Buffer	2.0 µl
25XdNTPkarışımı	0.8 µl
10X RT Random Primer	2.0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µl
Nükleaz içermeyen Su	4.2 µl

Çizelge 3.3. cDNA sentezi protokolü

	1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama	4. Aşama
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	10 dakika	120 dakika	4 dakika	∞

3.2.10. Real Time PCR

İlgili genlerin mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi için, Applied Biosystems 7500 cihazında Taqman Gene Expression Assayler kullanılmıştır. Her örnek duplike çalışılmıştır.

HIF1A, Hs00153153_m1

HIF2A, Hs01026149_m1

SOX2, Hs01053049_s1
NANOG, Hs04260366_g1
OCT4, Hs00999632_g1
CD133, Hs01009250_m1
ESRRA, Hs01067166_g1
ACTB, Hs99999903_m1

Real Time PCR karışımı Çizelge 3.4'teki gibi hazırlanmıştır. Applied Biosistem 7500 Real time- PCR cihazında program Çizelge 3.5'teki gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3.4. Real Time RT- PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

PCR Reaksiyon karışım bileşenleri	1X (20 µl)
20X TaqMan Gene Expression Assay	1.0 µl
2X TaqMan Gene Expression Master Mix	10.0 µl
cDNA örneği	4.0 µl
RNAaz- içermeyen su	5.0 µl

Çizelge 3.5. Applied Biosystems 7500 real -time RT-PCR için kullanılan Program

	Isı Döngüsü Koşulları	
Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (dd: ss)
Hold	50	2:00
Hold	95	10:00
Döngü (40 Döngü)	95	0:15
	60	1:00

3.2.11. İstatistiksel Analiz

RT-PZR için normalizasyonda β -aktin geni kullanıldı. Hedef gen ekspresyon seviyesi analizleri yapılan genler ΔC_t değerleri hesaplanarak rölatif kantitasyon yöntemleri kullanılarak incelendi. Tümör ve kontrol grupların karşılaştırılmasında eşli karşılaştırma testi uygulanmıştır. Tümörlü dokularda genler arasındaki korelasyon analizi Pearson Korelasyon Katsayısı'na göre yapılmıştır (r: korelasyon katsayısının değeridir, ilişkinin yüzdesini ifade eder). Gen ekspresyonu ve klinopatolojik özellikler arasındaki ilişki student t testi ile saptanmıştır. Hipoksiye maruz kalma süreleri ve XCT-790 uygulaması bakımından her bir genin ekspresyon değerleri arasındaki farklılık kruskal wallis testi ile araştırılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Bilgileri

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda opere edilen ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü tarafından skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulanan 26 Larinks Kanseri tümör örneğinin patolojik inceleme sonuçları ve hastalara ait bilgiler Çizelge 4.1'de verilmektedir. 26 erkek hastadan sağlanan tümör dokularının hepsi total larenjektomi ile elde edilmiştir. Patolojik incelemeler sonucunda histolojik grade, 14 hastada I, 11 hastada II, 1 hastada III olarak tespit edilmiştir. Tümör yerleşimi ağırlıklı olarak glottik bölge olan hasta grubunda yaş ortalaması 63,2 bulunmuştur. Hastalara ait klinik ve patolojik bilgileri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. Hastalardan Tri REagent kiti kullanılarak yapılan izolasyon sonucu elde edilen toplam 52 adet RNA'ya ait konsantrasyon ve saflık değerleri çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi K.B.B Anabilim Dalı'nda opere edilen larinks kanseri tümör örneklerine ait bilgiler.

Örnek Adı	Yaş/ Cinsiyet	Ameliyat Türü	Tümör Çapı (cm)	TNM evresi	Histolojik Grade	Yerleşim	Patolojik Tanı
1.B K	E/63	Total larenjektomi	1,5cm	T1N1	Diferansiye Grade I	Subglottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
2.A S	E/ 65	Total larenjektomi	3 x 0.7cm		Diferansiye Grade I	Stoma çevresi	Skumöz hücreli karsinom
3.H K	E/78	Total larenjektomi	1,5x1,5x0,5 cm	T1N0	Diferansiye Grade I		Skumöz hücreli karsinom
4.H K	E/57	Total larenjektomi	12X11 mm	T1N0	Diferansiye Grade I	Peristomal Bölge	Skumöz hücreli karsinom
5.Ş D	E/54	Total larenjektomi	2,5 cm	T4N0	Orta derecede diferansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
6.A G	E/74	Total larenjektomi	4cm	T4N2	Az Diferansiye Grade III	Sol glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
7.A K	E/67	Total larenjektomi	3x3x3 cm	T2N2	Orta derecede diferansiye Grade II	Sağ glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
8.R A	E/58	Total larenjektomi	5cm	T2N0	Orta derecede diferansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
9.C Y	E/66	Total larenjektomi	2.5cm	T2N0	Diferansiye Grade I	Sağ glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
10.D E	E/50	Total larenjektomi	3 cm	T4N2	Orta derecede diferansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
11.E B	E/60	Total larenjektomi	4x3 cm	T4N0	Diferansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
12.H İ Y	E/62	Total larenjektomi	3.5cm	T4	Orta derecede diferansiye Grade II	Subglottik bölge	Skumöz hücreli karsinom

Tablo 4.1. Devamı

13.Ş S	E/67	Total larenjektomi	2cm	T1N0	Diferansiye Grade I	Sağ aryepiglottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
14.A D	E/65	Total larenjektomi	3.5cm	T4N2	Orta derecede differansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
15.Y A	E/49	Total larenjektomi	1,5x1,5cm	T1N0	Diferansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
16.N S	E/74	Total larenjektomi	2cm	T3N0	Diferansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
17.M K	E/ 57	Total larenjektomi	5x4x2,5 cm	T3N0	Orta derecede differansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
18.İ T	E/63	Total larenjektomi	3,5x2x1,5 cm	T3N1	Orta derecede differansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
19.Y K	E/58	Total larenjektomi	4.5cmx3cm	T4N0	Differansiye Grade I	Subglottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
20.D M A	E/76	Total larenjektomi	4cm	T4N1	Orta derecede differansiye Grade II	Aryepiglottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
21.N Ü	E/70	Total larenjektomi	3cm	T3N0	Differansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
22.N T	E/62	Total larenjektomi	5cm	T4N0	Orta derecede differansiye Grade II	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
23. S Z T	E/59	Total larenjektomi	5cm	T3N0	Differansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
24. M Ü	E/64	Total larenjektomi	3cm	T4N0	Diferansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
25. D B	E/ 58	Total larenjektomi	3cm	T2N0	Orta derecede differansiye Grade II	Glottik ve Aryepiglottik bölge	Skumöz hücreli karsinom
26.İ K	E/ 69	Total larenjektomi	3cm	T3N1	Diferansiye Grade I	Glottik bölge	Skumöz hücreli karsinom

Çizelge 4.2. 26 skuamöz hücreli larinks kanseri hastasına ait klinik ve patolojik özellikler.

Toplam Hasta Sayısı: 26	
Yaş	
≤ 60	10
> 60	16
Cinsiyet	
Kadın	-
Erkek	26
Sigara	
Var	26
Yok	-
Alkol	
Var	2
Yok	24
Tümör yerleşimi	
Supraglottik	-
Subglottik	3
Glottik	18
Diğer	4
T evresi	
T1 ve T2	9
T3 ve T4	16
Histolojik grade	
1	14
2	11
3	1
Tümör çapı	
≤ 2 cm3	6
> 2 cm3	20

Çizelge 4.3. Hastaların tümör ve normal dokusundan elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Örnek Numarası	ng/µl (Tümör doku/Normal Doku)	A260/A280 (Tümör doku/Normal Doku)
1	63,2 / 178	1,82 / 1,85
2	836,1 / 338	1,89 / 1,96
3	128,6 / 72,4	1,78 / 1,86
4	168 / 186	1,79 / 1,97
5	247 / 762,1	1,81 / 1,89
6	256,4 / 62,6	1,89 / 2,06
7	978,5 / 94,2	1,81 / 2,07
8	612 / 338	1,9 / 1,77
9	434 / 94,8	1,81 / 1,9
10	188 / 69,6	1,91 / 1,82
11	618 / 874	1,79 / 1,9
12	128 / 120	1,81 / 1,81
13	106 / 668	1,81 / 1,79
14	377 / 74,8	1,95 / 1,94
15	352 / 328	1,93 / 1,94
16	66,8 / 205	1,83 / 1,9
17	69,2 / 168	1,81 / 1,93
18	187,3 / 127,6	1,91 / 1,81
19	239,2 / 54,8	1,82 / 1,95
20	289,2 / 69,6	1, 86/ 1,87
21	270,1 / 178	1,94 / 1,94
22	168 / 197,8	1,84 / 1,92
23	375 / 91,6	1,88 / 1,89
24	223,1 / 46,4	1,92 / 1,9
25	96,6 / 130,3	1,78/ 1,87
26	128,9 / 242,3	1,88 / 1,91

4.2. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA Genlerinin Ekspresyon Değerlendirilmesi

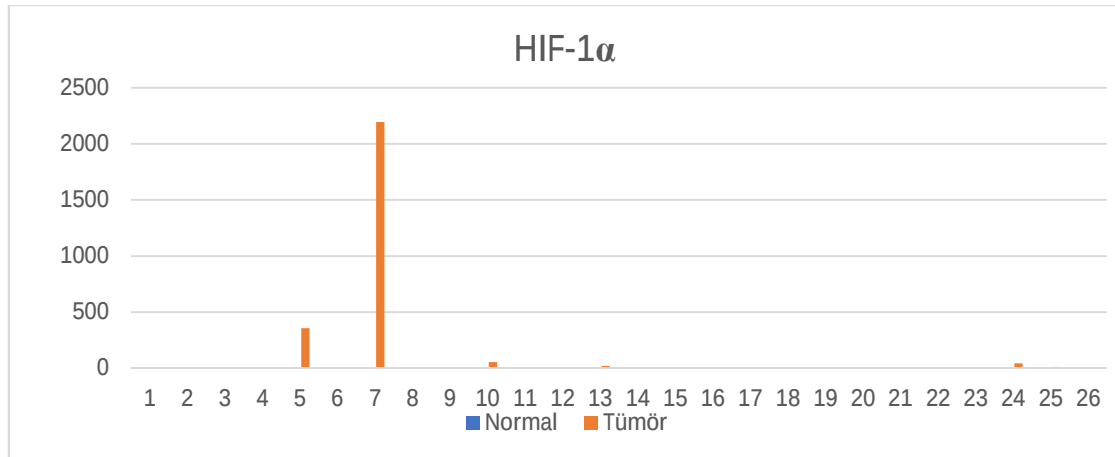
Tümör dokusunda her gen için rölatif gen ekspresyon değerlendirilmesi için $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanıldı. $0.5 < RQ$ değerleri azalan ekspresyon, $0.5 < RQ < 2$ değerleri normal ekspresyon, $RQ > 2$ değerleri artmış ekspresyon olarak değerlendirildi⁸².

4.2.1. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında HIF-1 α ve HIF-2 α Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Çalışmalar HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonlarının genelde post transkripsiyonel seviyede düzenlendiğini gösterse de hipoksiye maruziyette, mRNA düzeyinde düzenlenme olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.

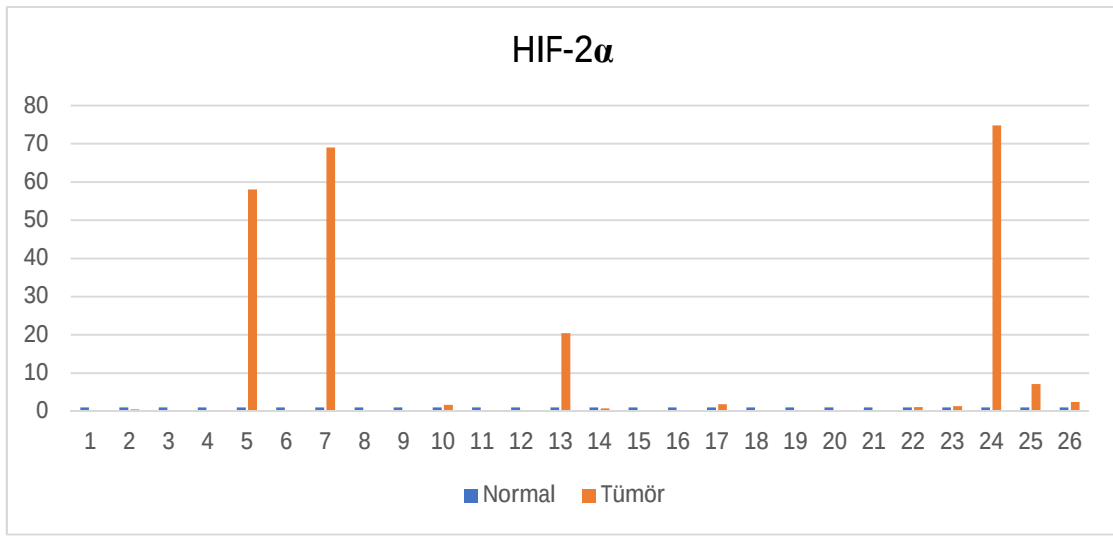
Çalışmamızda 26 larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında HIF-1 α gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 14 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı, 3 hastada ekspresyonun normal olduğu, 9 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Normal doku ile tümörlü doku arasında HIF-1 α ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p < 0.05$, $p = 0.044$, $t = -2.135$) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. 26 Larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında HIF-1 α gen ekspresyonu



26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında HIF-2 α gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 6 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı, 6 hastada ekspresyonun normal olduğu, 14 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Normal doku ile tümörlü doku arasında HIF-2 α ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.067$, $t=-1.914$) (Çizelge 4.5).

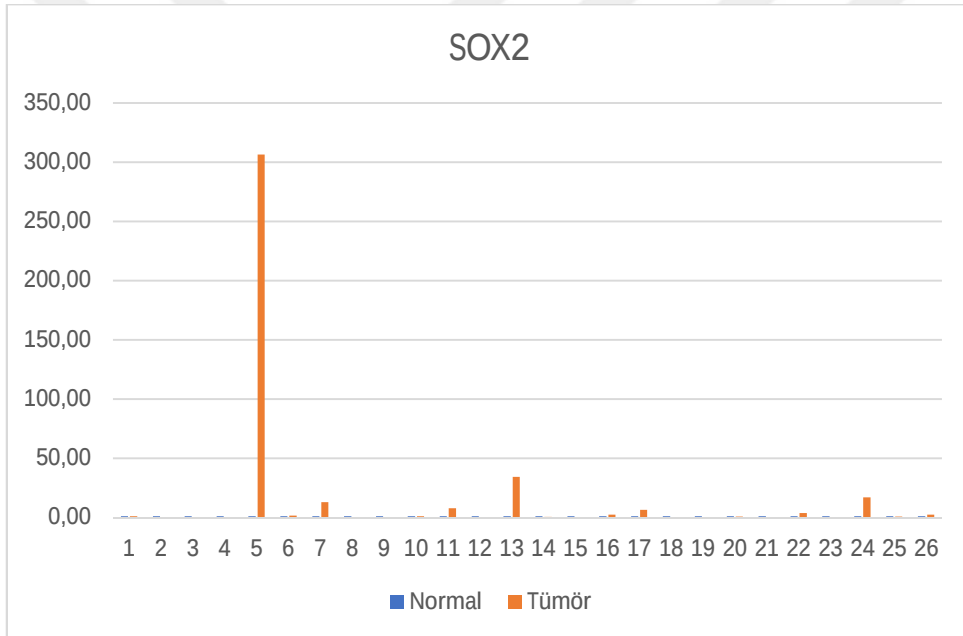
Çizelge 4.5. 26 larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında HIF-2 α gen ekspresyonu



4.2.2. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında SOX2 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında SOX2 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 9 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı, 6 hastada ekspresyonun normal olduğu, 11 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Normal doku ile tümörlü doku arasında SOX2 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.095$, $t=-1.739$) (Çizelge 4.6).

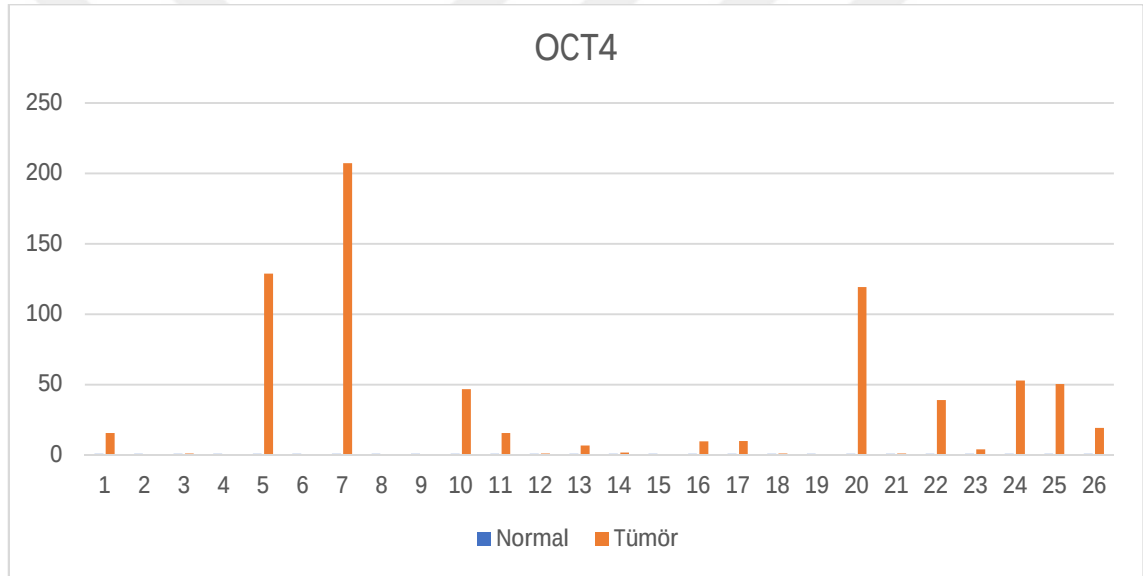
Çizelge 4.6. 26 Larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında SOX2 gen ekspresyonu



4.2.3. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında OCT4 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında OCT4 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 14 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı, 5 hastada ekspresyonun normal olduğu, 7 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Normal doku ile tümörlü doku arasında OCT4 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$, $p=0.006$, $t=-3.012$) (Çizelge 4.7).

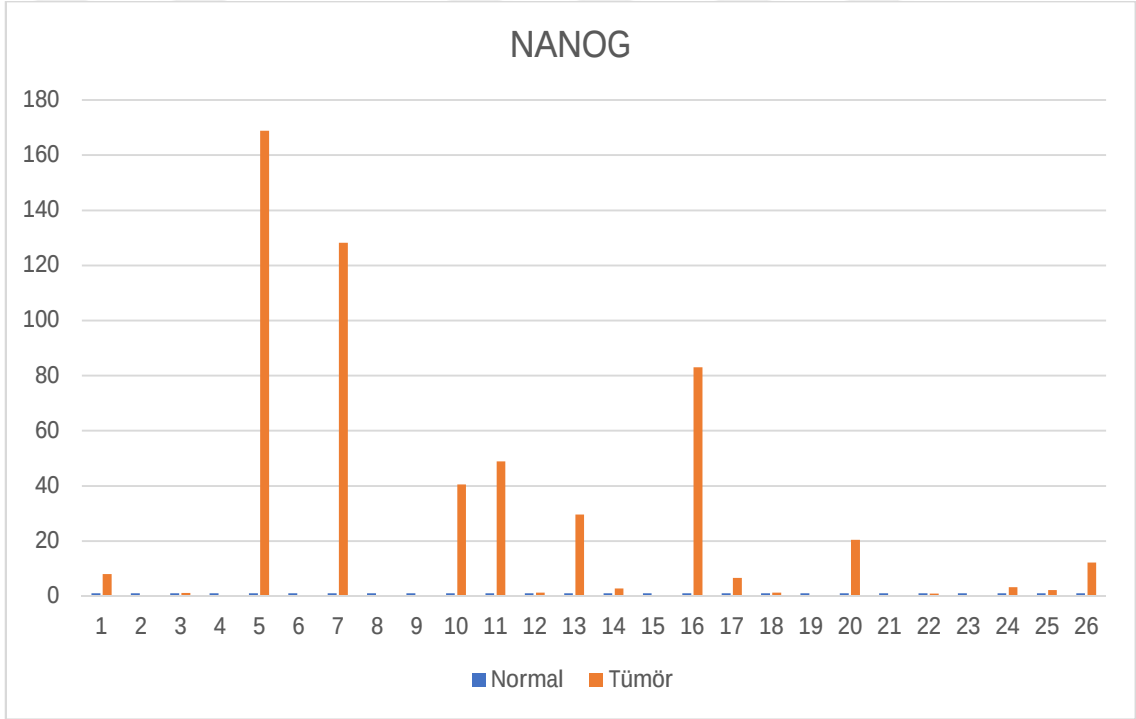
Çizelge 4.7. 26 larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında OCT4 gen ekspresyonu



4.2.4. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında NANOG Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında NANOG gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 13 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı, 4 hastada ekspresyonun normal olduğu, 9 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Normal doku ile tümörlü doku arasında NANOG ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$, $p=0.026$, $t=-2.386$) (Çizelge 4.8).

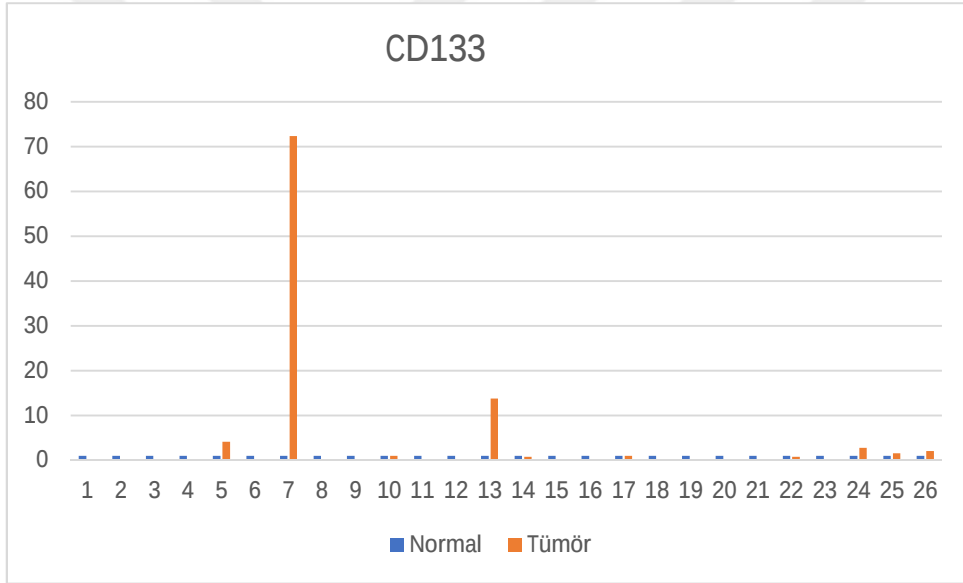
Çizelge 4.8. 26 larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında NANOG gen ekspresyonu



4.2.5. Larinks Kanseri Hastaların Tümör ve Normal Dokularında CD133 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında CD133 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 5 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı 5 hastada ekspresyonun normal olduğu, 15 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. 1 hastanın tümör dokusunda gen ekspresyonu tespit edilememiştir. Normal doku ile tümörlü doku arasında CD133 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.304$, $t=-1.050$) (Çizelge 4.9).

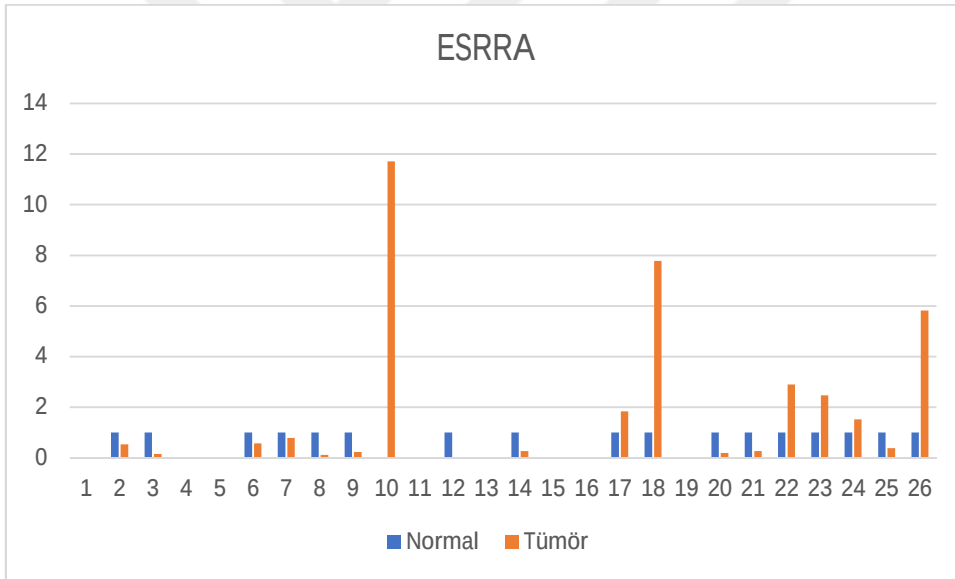
Çizelge 4.9. 26 Larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında CD133 gen ekspresyonu



4.2.6. Larinks Kanserli Hastaların Tümör ve Normal Dokularında ESRRA Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

26 Larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında ESRRA gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 5 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı saptanmış, 5 hastada ekspresyonun normal olduğu, 8 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. 1 hastanın tümör dokusunda, 6 hastanın normal dokusunda, 1 hastanın ise hem tümör hem de normal dokusunda gen ekspresyonu tespit edilememiştir. Normal doku ile tümörlü doku arasında ESSRA ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.170$, $t=-1.434$) (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. 26 larinks kaseri hastasının tümör ve normal dokularında ESRRA gen ekspresyonu



4.2.7. Tümörlü Dokularda Genler arasındaki Korelasyonun Değerlendirilmesi

Tümörlü dokularda;

- HIF-1 α geni ekspresyonu ile diğer genlerin ekspresyon değerleri arasında korelasyon yoktur ($p>0.05$).
- HIF-2 α geni ile CD133 ($r=0.70$, $p<0.05$, $p=0.001$) ve ESRRA ($r=0.67$, $p<0.05$, $p=0.004$) genlerinin ekspresyon değerleri arasında pozitif korelasyon vardır ve istatistiksel olarak önemlidir.
- CD133 ile ESRRA geni ekspresyonları arasında da pozitif yönde bir korelasyon vardır ve istatistiksel olarak önemlidir ($r=0.734$, $p<0.05$, $p=0.001$).
- Nanog ile OCT4 arasında 0.07 önem seviyesinde istatistiksel olarak önemli olan pozitif bir korelasyon vardır ($p=0.07$, $r=0.423$).

4.2.8. Gen ekspresyonlarının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi

Bu çalışmada tümör dokularında tespit edilen gen ekspresyon seviyeleri ile TNM sınıflandırması, histolojik grade, yaş, tümör çapı ve tümör bölgesi durumu arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

- HIF-1 α gen ekspresyon seviyesi;
- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir fark göstermemektedir ($p>0.05$, $p=0.531$, $t=0.654$).
- Ø Tümörlü dokuda, tümör yeri bakımından istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p>0.05$, $p=0.089$, $t=1.794$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.192$, $t=-1.356$).
- Ø Yaş grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.279$, $t=1.158$).
- Ø Tümör çapına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$, $p=0.005$, $t=-3.302$).

· HIF-2 α gen ekspresyon seviyesi;

- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir farklılık yoktur ($p>0.05$, $p=0.328$, $t=1.049$).
- Ø Tümörlü dokuda, tumor yeri bakımından glottik bölge ve diğer bölgeler arasında istatistiksel olarak farklılık göstermektedir ($p<0.05$, $p=0.014$, $t=2.838$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.129$, $t=-1.654$).
- Ø Yaş grupları arasında HIF-2 α ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.257$, $t=1.215$).
- Ø Tumor çapına göre grupların HIF-2 α ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$, $p=0.009$, $t=-2.985$).

· SOX2 gen ekspresyon seviyesi;

- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır ($p<0.05$, $p=0.048$, $t=-2.173$).
- Ø Tümörlü dokuda, tumor yeri bakımından SOX2 geni ekspresyonları istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermektedir ($p<0.05$, $p=0.034$, $t=2.324$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında SOX2 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.684$, $t=0.415$).
- Ø Yaş grupları arasında SOX2 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.441$, $t=0.804$).
- Ø Tumor çapına göre grupların SOX2 ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$, $p=0.354$, $t=0.955$).

· OCT4 gen ekspresyon seviyesi;

- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır ($p < 0.05$, $p = 0.023$, $t = -2.497$).
- Ø Tümörlü dokuda, tumor yeri bakımından OCT4 geni ekspresyonları istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermektedir ($p < 0.05$, $p = 0.008$, $t = 3.072$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında OCT4 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p < 0.05$, $p = 0.038$, $t = -2.384$).
- Ø Yaş grupları arasında OCT4 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.218$, $t = 1.321$).
- Ø Tumor çapına göre grupların OCT4 ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$, $p = 0.124$, $t = -1.601$).

· NANOG gen ekspresyon seviyesi;

- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır ($p < 0.05$, $p = 0.023$, $t = -2.497$).
- Ø Tümörlü dokuda, tumor yeri bakımından NANOG geni ekspresyonları istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$, $p = 0.147$, $t = -1.629$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında NANOG ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.085$, $t = -1.913$).
- Ø Yaş grupları arasında NANOG ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.168$, $t = 1.516$).
- Ø Tumor çapına göre grupların NANOG ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$, $p = 0.546$, $t = 0.675$).

· CD133 gen ekspresyon seviyesi;

- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır ($p < 0.05$, $p = 0.014$, $t = -2.790$).
- Ø Tümörlü dokuda, tumor yeri bakımından CD133 geni ekspresyonları istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermektedir ($p < 0.05$, $p = 0.007$, $t = 3.124$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında CD133 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p < 0.05$, $p = 0.024$, $t = -2.766$).
- Ø Yaş grupları arasında CD133 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.867$, $t = -0.170$).
- Ø Tumor çapına göre grupların CD133 ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$, $p = 0.015$, $t = -2.698$).

· ESRRA gen ekspresyon seviyesi;

- Ø Erken evre (T1+T2) ve geç evre (T3+T4) tümörlerde karşılaştırıldığında; istatistiksel olarak önemli bir farklılık vardır ($p < 0.05$, $p = 0.032$, $t = -2.478$).
- Ø Tümörlü dokuda, tumor yeri bakımından ESRRA geni ekspresyonları istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermektedir ($p < 0.05$, $p = 0.026$, $t = 2.531$).
- Ø Grade 1 ve grade 2 arasında ESRRA ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.925$, $t = 0.096$).
- Ø Yaş grupları arasında ESRRA ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.225$, $t = 1.510$).
- Ø Tumor çapları arasında ESRRA geni ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$, $p = 0.689$, khi-kare değeri = 0.16).

4.3. Hipoksi Muamelesi

Hücrelerin hipoksi muamelesinde Anaerogen compact (AnaeroGen Compaq AN0010C, Oxoid, Cambridge, UK) kullanıldı. Hücreler önce plate'e ekilip kültürleri yapılarak %75 confluenceye (yoğunluğa) ulaşması beklendi. Her plate, hipoksiyi tetikleyecek bir torba ile birlikte üretici firma tarafından sağlanan plastik poşetlere konarak ağzı hızlıca kapatıldı. Hücreler 37 °C %5 CO₂ inkübatörde 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakıldı. Hipoksiye maruz bırakılmayan kontrol grubu hücreleri 37 °C %5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi (Şekil 4.1).

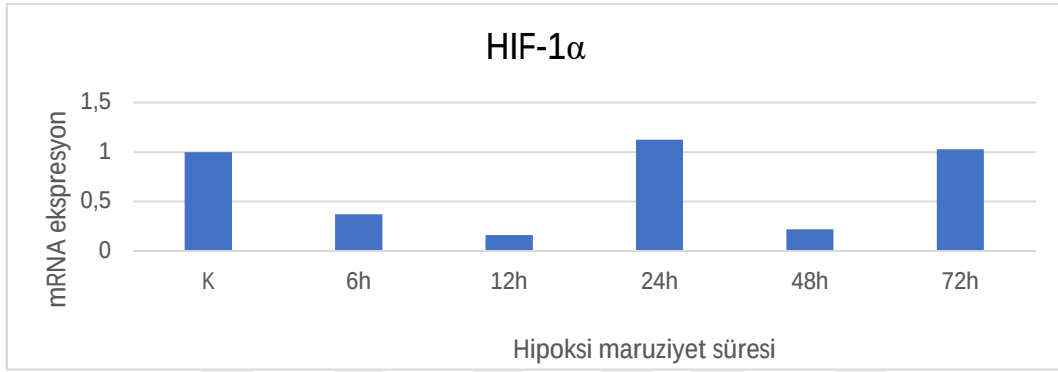


Şekil 4.1. Hipoksi Muamelesi

4.3.1. Hep-2 Hücreleri Hipoksi Muamelesi

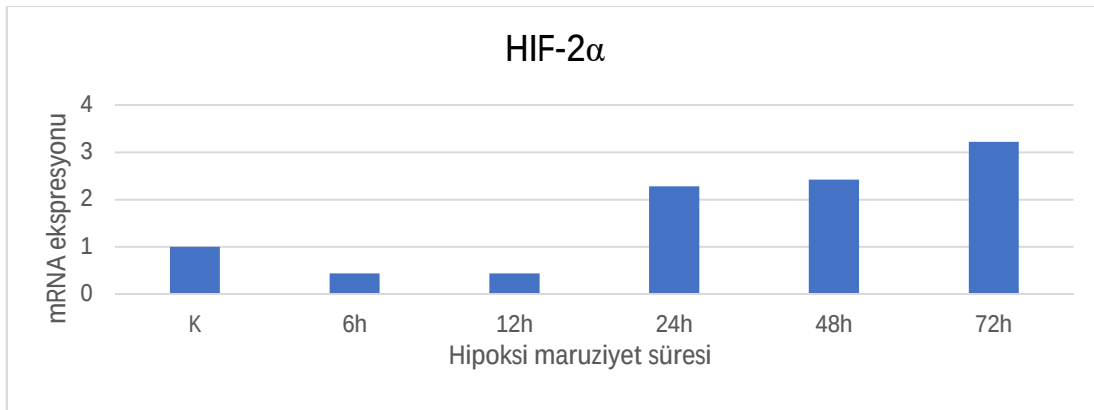
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde HIF-1 α mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.11’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile HIF-1 α gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$)

Çizelge 4.11. Hep-2 hücrelerinde HIF-1 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



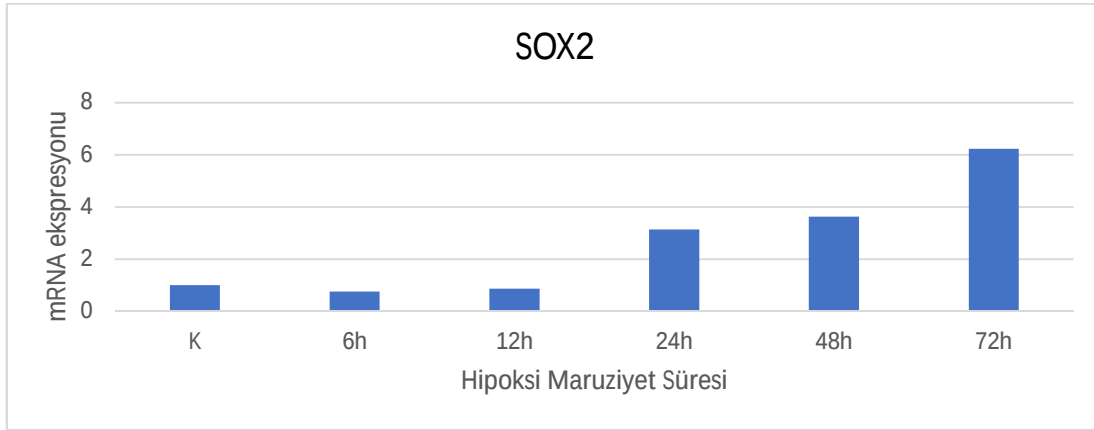
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde HIF-2 α mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.12’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile HIF-2 α gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.12. Hep-2 hücrelerinde HIF-2 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



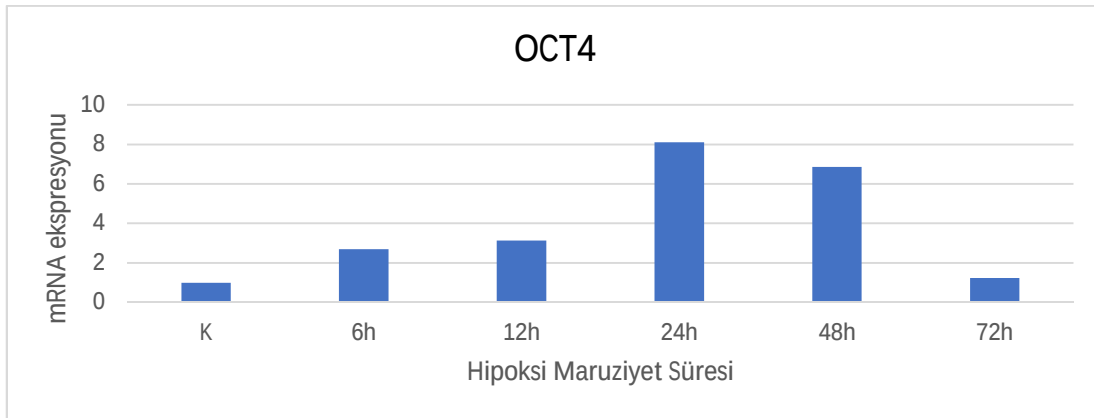
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde SOX2 mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.13'te gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile SOX2 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.13. Hep-2 hücrelerinde SOX2 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



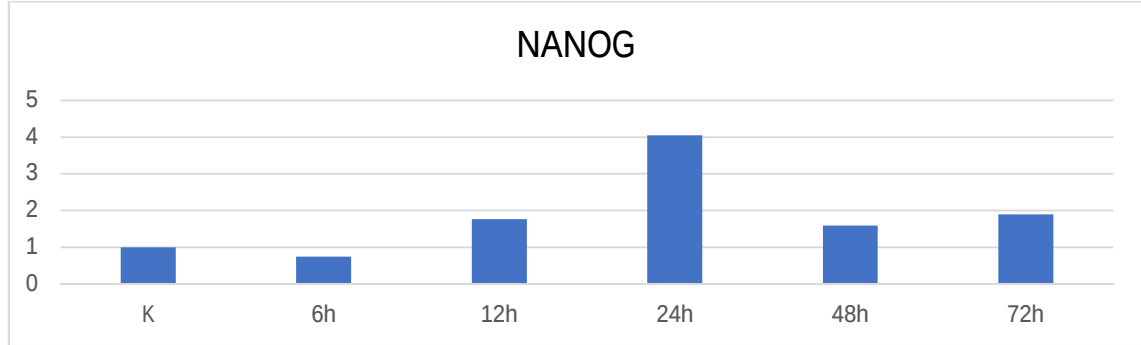
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde OCT4 mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile OCT4 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.14. Hep-2 hücrelerinde OCT4 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



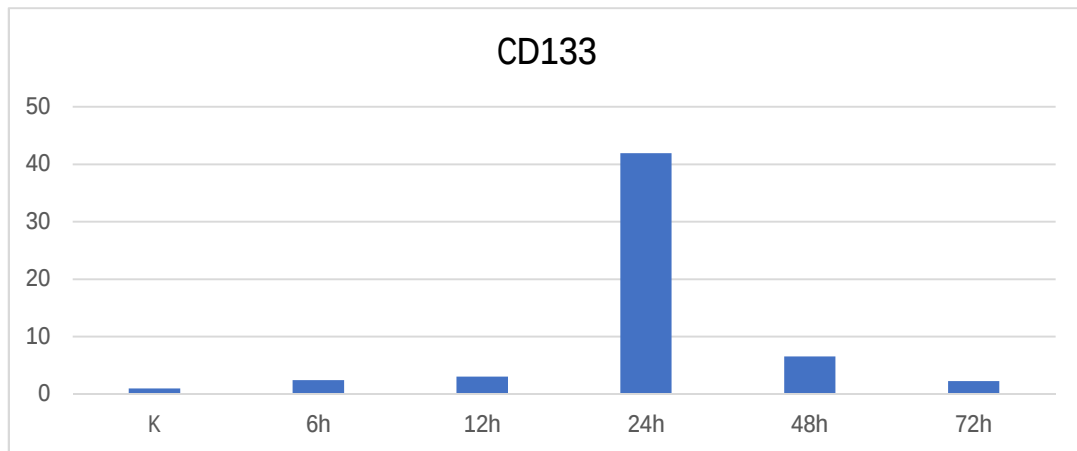
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde NANOG mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.15'te gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile NANOG gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.15. Hep-2 hücrelerinde NANOG mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



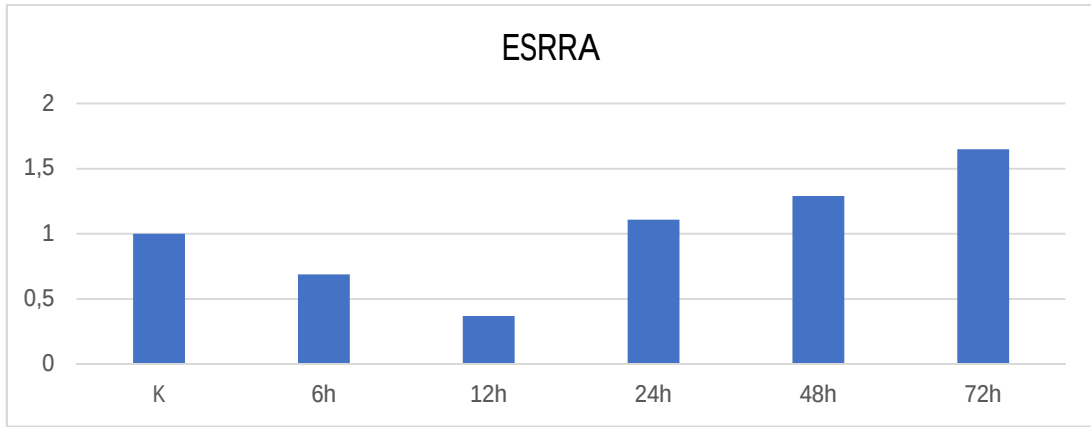
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde CD133 mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.16'da gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile CD133 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.16. Hep-2 hücrelerinde CD133 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde ESRRA mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.17’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile ESRRA gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

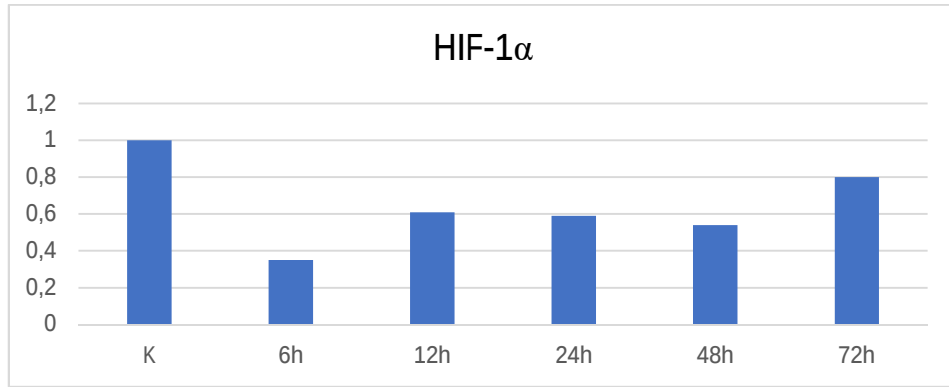
Çizelge 4.17. Hep-2 hücrelerinde ESRRA mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



4.3.2. FaDu Hücreleri Hipoksi Muamelesi

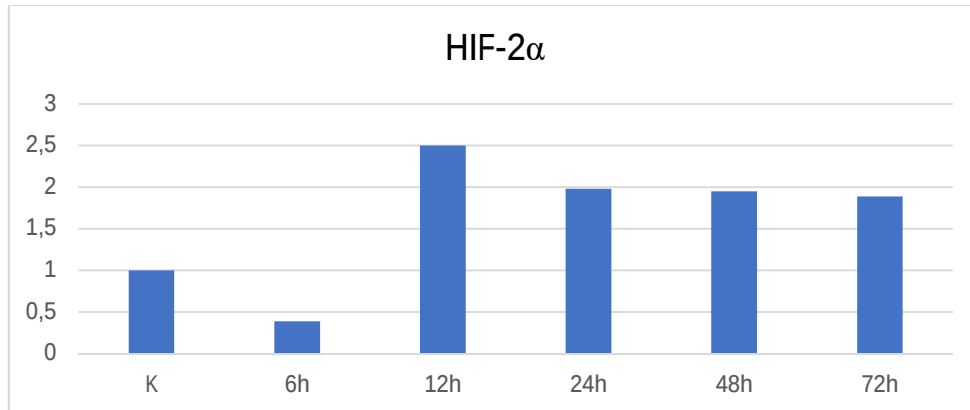
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde HIF-1 α mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.18’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile HIF-1 α gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.18. FaDu hücrelerinde HIF-1 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



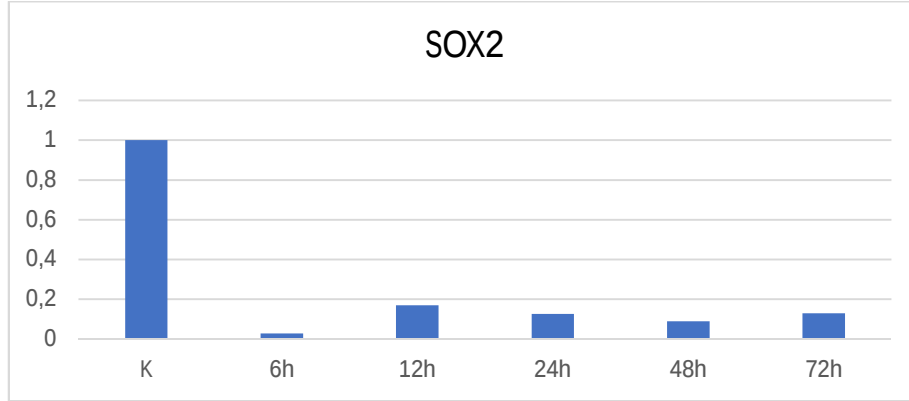
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde HIF-2 α mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.19’da gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile HIF-2 α gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.19. FaDu hücrelerinde HIF-2 α mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



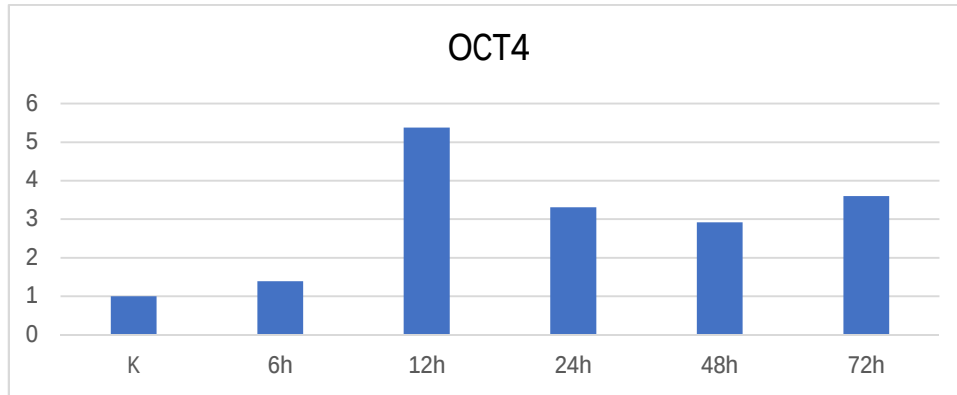
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde SOX2 mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.20’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile SOX2 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.20. FaDu hücrelerinde SOX2 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



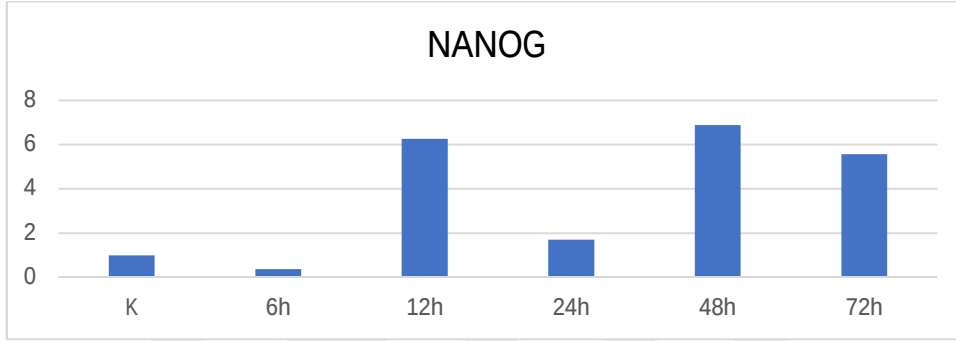
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde OCT4 mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.21’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile OCT4 gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.21. FaDu hücrelerinde OCT4 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



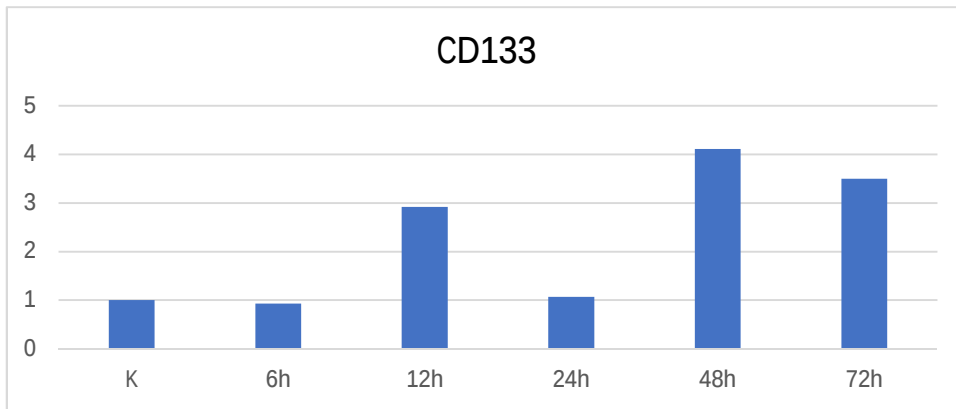
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde NANOG mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.22’de gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile NANOG gen eksresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.22. FaDu hücrelerinde NANOG mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



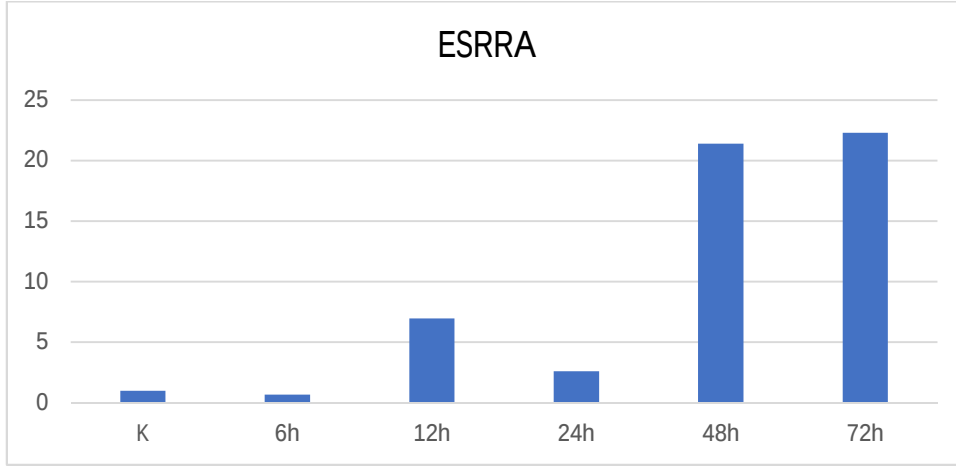
- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde CD133 mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.23’te gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile CD133 gen eksresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

Çizelge 4.23. FaDu hücrelerinde CD133 mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



- 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde ESRRA mRNA seviyesinin değişimi Çizelge 4.24'te gösterilmiştir. Hipoksi uygulaması ile ESRRA gen ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p<0.05$).

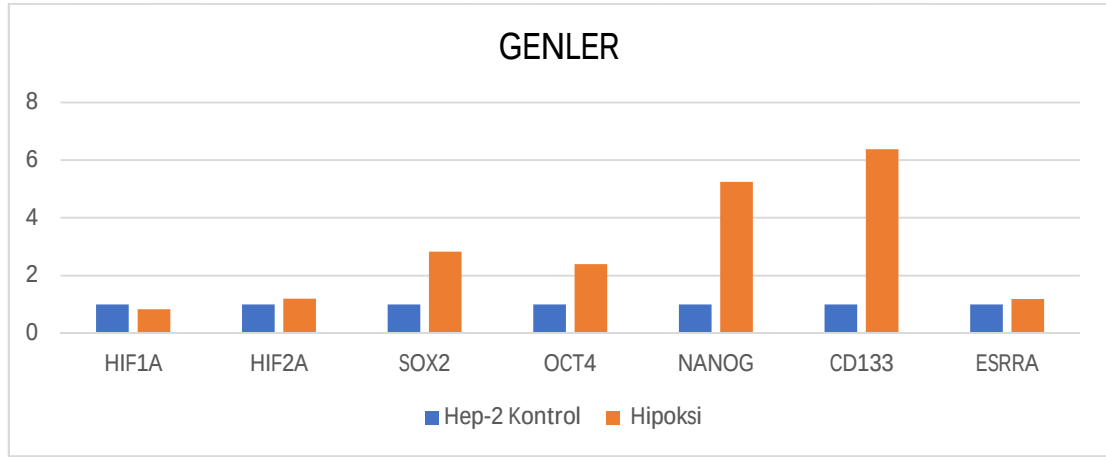
Çizelge 4.24. FaDu hücrelerinde ESRRA mRNA seviyesinin 6, 12, 24, 48, 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruziyet sonucu değişimi.



4.3.3. HEP2 Hücreleri XCT790 Muamelesi

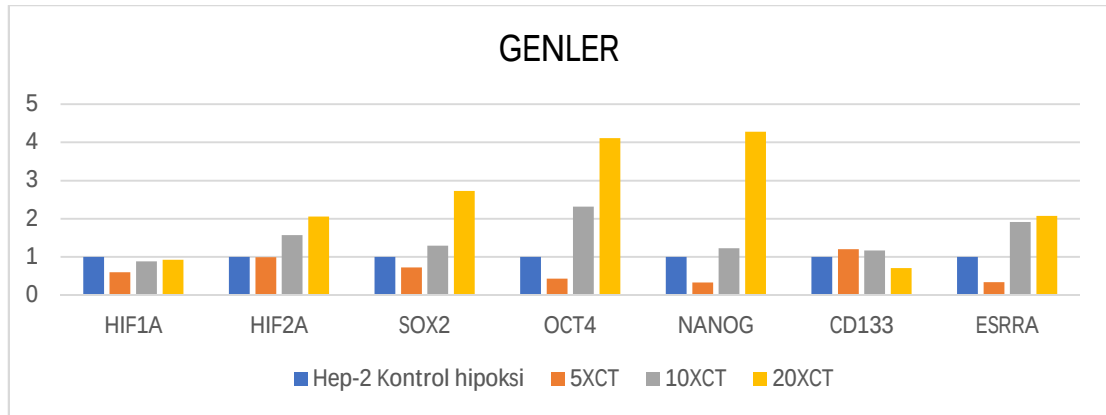
XCT790 muamelesinden önce HEP-2 hücreleri 72 saat hipoksiye maruz bırakılarak genlerin ekspresyon değişimleri saptanmıştır (Çizelge 4.25). Farklı konsantrasyonlarda XCT-790 uygulamaları arasında genlerin ekspresyonları bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p < 0.05$) (HIF-1 α $p = 0.02$, HIF-2 α $p = 0.03$, SOX $p = 0.02$, OCT4 $p = 0.02$, NANOG $p = 0.02$, CD133 $p = 0.02$, ESRRA $p = 0.02$) (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.25. XCT790 muamelesi öncesi Hep-2 hücrelerinde hipoksinin neden olduğu gen ekspresyon değişim çizgesi.



ESRRA inhibitörü olan XCT790'nın farklı dozlarda uygulanması sonucunda genlerin mRNA ekspresyonlarındaki değişim Çizelge 4.26'da gösterilmiştir.

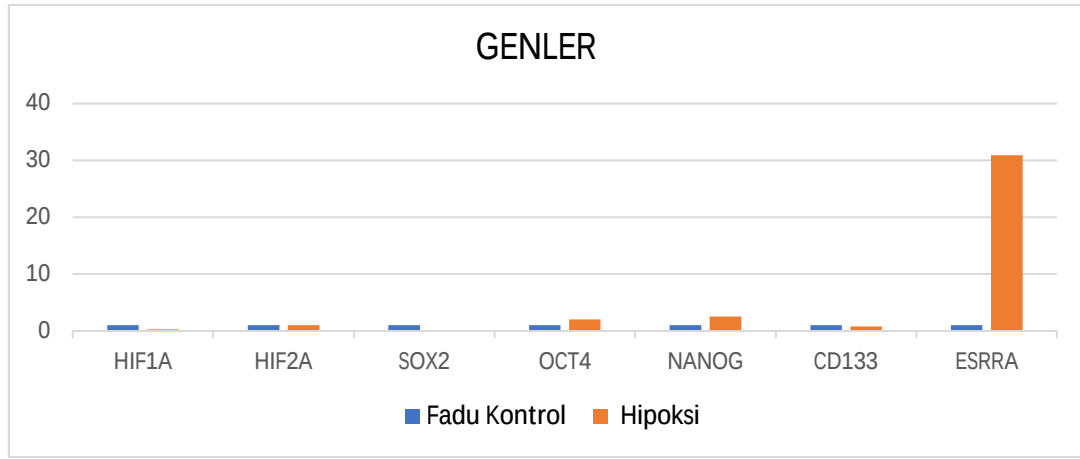
Çizelge 4.26. Farklı dozlarda XCT790 uygulaması sonucu gen ekspresyonlarındaki değişim.



4.3.4. FaDu Hücreleri XCT790 Muamelesi

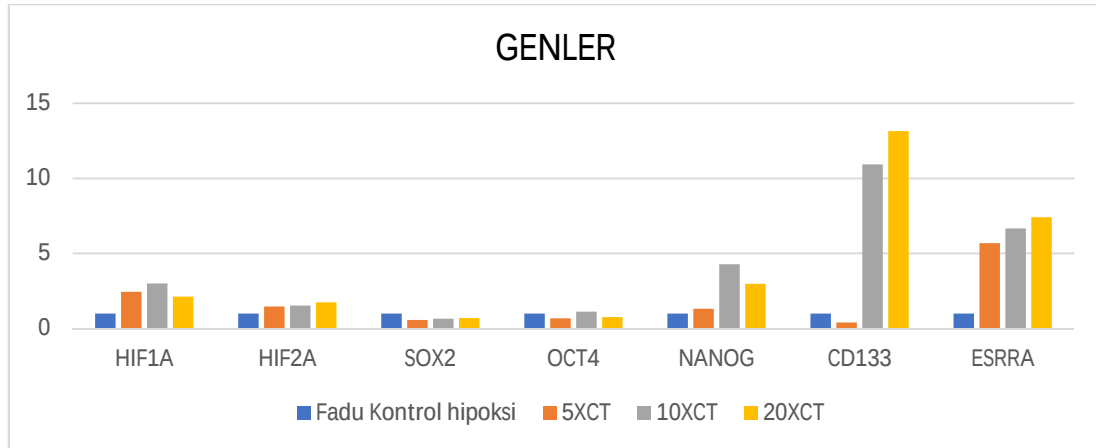
XCT790 muamelesinden önce FaDu hücreleri 48 saat hipoksiye maruz bırakılarak genlerin ekspresyon değişimleri saptanmıştır (Çizelge 4.27). Farklı konsantrasyonlarda XCT790 uygulamaları arasında genlerin ekspresyonları bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark vardır ($p < 0.05$) (Tüm genler için $p = 0.0001$) (Çizelge 4.28).

Çizelge 4.27. XCT790 muamelesi öncesi FaDu hücrelerinde hipoksinin neden olduğu gen ekspresyon değişimi.



ESRRA inhibitörü olan XCT790'nın farklı dozlarda uygulanması sonucunda genlerin amRNA ekspresyonlarındaki değişim Çizelge 4.28'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.28. Farklı dozlarda XCT790 uygulaması sonucu gen ekspresyonlarındaki değişim.



5. TARTIŞMA

Çalışmamızı, larinks kanser patogeneğinde hipoksi ve embriyonik kök hücrelerinin etkisini ve hastalığın klinopatolojik özellikleri ile ilişkisini aydınlatabilmek için skuamöz hücreli karsinom oldukları patoloji raporu ile doğrulanan 26 larinks kanser hastasından alınan doku örnekleri ile yaptık. Aldığımız örneklerin patolojik incelemeler sonucunda tümör evresi, 14 hastada grade I, 11 hastada grade II, 1 hastada grade III olarak tespit edilmiştir. Tümör yerleşimlerinin ağırlıklı olarak glottik bölge olduğu tespit edilmiş olup hasta grubunda yaş ortalaması 63,2 bulunmuştur. TNM evresi (Tümör-Nod-Metastaz) 9 hastada T1-T2, 16 hastada T3-T4 olarak saptanmıştır. Bir hastanın ise bilgisine ulaşamamıştır.

Çalışmamızda ayrıca hipoksinin, larinks kanser hücrelerinde embriyonik kök hücre genleri üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Hep-2 larinks ve FaDu farinks hücreleri hipoksiye maruz bırakılmış ve gen ekspresyonlarındaki değişim Real Time PCR ile değerlendirilmiştir.

5.1. Hipoksi Muamelesi

Hipoksi, organ, doku ya da hücrelerde oksijen azalması veya eksikliği olarak tanımlanmaktadır. Bu azalma, yetersiz kan damar ağı, anormal kan damarları veya anemi kaynaklı olarak oksijen sağlanmasında azalma ya da yüksek hücre proliferasyonu nedeniyle oksijen tüketiminin artmasına bağlı olabilir. Hipoksi fizyolojik olabileceği gibi kanser, romatoid artrit, ateroskleroz gibi durumlarda patolojik de olabilir. Hipoksik ortam memeli hücre kültürlerinde genellikle CoCl_2 solüsyonu ya da hipoksi inkübatörleri ile sağlanmaktadır⁸³

Son yıllarda daha hesaplı ve basit olan ayrıca özel gaz kombinasyonlarına ihtiyaç duymaması sebebiyle, klinik mikrobiyolojide anaerobik canlıların üretiminde rutin olarak kullanılan alternatif bir metot, memeli hücrelerini hipoksiye maruz bırakmak için kullanılmaktadır. Bu metotta hipoksik ortam oluşturmak için, plastik bir torba içerisine, oksijen seviyesini yarım saat içinde %1 seviyesine düşürecek askorbik asit içeren bir paket koyulup ağzı kapatılmakta, poşetin içine yerleştirilen anaerobik indikatörle deney koşulları kontrol edilmektedir. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında

benzer sonuçlara ulaşıldığından hipoksi muamelesinde bu yöntemin kullanıldığı çeşitli tez çalışmaları ve yayınlar bulunmaktadır⁸⁴⁻⁹².

Biz de çalışmamızda “Anaerogen W-Zip Compact” sistemi kullanarak hücreleri hipoksiye maruz bıraktık. İndikatör yardımı ile de hipoksinin devamlılığını takip ettik.

5.2. HIF-1 α ve HIF-2 α

Solid tümörlerin en yaygın özelliği olan ve en önemli çevresel streslerden biri hipoksidir. Hipoksinin kanser gelişiminde önemli ve kompleks bir rolü vardır⁽¹¹⁾. Kanser hücreleri bu hipoksik çevreye uyum sağlamak için adaptasyon geliştirir. Hipoksiye adaptif cevap, hipoksik gen ekspresyonunun ve oksijen homeostazının ana düzenleyicisi olan HIF’lar ile sağlanır⁴⁷.

Çalışmamızda Hep-2 ve FaDu hücrelerini 6-12-24-48 ve 72 saatlik sürelerde hipoksiye maruz bıraktığımızda her iki hücre serisinde gruplar arasında HIF-1 α ve HIF-2 α ’nın mRNA ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim saptandı (P.0,000; P<0,005). HIF-1 α ve HIF-2 α ekspresyonlarının genelde post transkripsiyonel seviyede düzenlendiği bilirse de hipoksiye maruziyette, mRNA düzeyinde de düzenlenme olduğunu gösteren hücre kültürü ve vaka-kontrol çalışmaları bulunmaktadır.

İnsan pulmoner arter düz kas hücrelerine hipoksinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bizim Hep-2 hücrelerimizle yaptığımız çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak hipoksiye maruz bırakılan farelerin akciğer dokusunda, *ex vivo* olarak hipoksiye maruz bırakılan akciğer doku örneklerinde ve pulmoner arter düz kas hücrelerinde HIF-1 α mRNA’sında artış saptanmıştır⁹³.

Akciğer kanser hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada hipoksiye maruziyette, Hep-2 hücreleri ile yaptığımız çalışmanın sonuçları ile uyumlu olarak HIF-1 α mRNA ekspresyonunun arttığı, ancak bizim sonucumuzdan farklı olarak HIF-2 α mRNA ekspresyonunun değişmediği, hücrelere anti proliferatif etkisi olan 2-methoxyestradiol uygulandığında her iki genin mRNA ekspresyonunda anlamlı derecede düşüş gözlemlendiği belirtilmiştir⁹⁴.

Glioma kök hücreleri ile yapılan bir çalışmada hücreler hipoksiye maruz bırakıldığında bizim çalışmamızdan farklı olarak HIF-1 α mRNA’sında anlamlı bir

değişim gözlenmezken, Hep-2 ve FaDu hücrelerindeki sonuçlarımızla uyumlu olarak HIF-2 α mRNA'sında anlamlı derecede artış gözlenmiştir⁹⁵.

Nöroblastomada HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın regülasyonunun araştırıldığı bir çalışmada bizim hücre kültüründe Hep-2 ve FaDu hücreleri ile yaptığımız çalışma ile uyumlu olarak hipoksinin HIF-2 α mRNA ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır⁹⁶.

İnsan embriyonik kök hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada, bizim sonuçlarımızdan farklı olarak fizyolojik ve düşük oksijen seviyelerinde HIF-1 α ve HIF-2 α mRNA ekspresyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır, ancak protein ekspresyonuna bakıldığında HIF-2 α 'nın düşük oksijen seviyelerinde anlamlı bir artış gösterdiği belirtilmiştir¹³.

Çalışmamızda 26 larinks kanseri hastasının normal dokusu ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda, HIF-1 α gen ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı ($p < 0.05$, $p = 0.044$, $t = -2.135$) saptanırken, HIF-2 α ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$, $p = 0.067$, $t = -1.914$). Çalışmamızda tümör evresi, tümör yeri, grade, yaş ile HIF-1 α ve HIF-2 α arasında bir ilişki saptanmazken, her iki genin tümör çapı ile de arasında ilişki saptanmıştır.

Pankreas kanseri ile yapılan farklı bir çalışmada ise bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak pankreatik tümör dokusu ile tümör çevresinden alınan doku karşılaştırıldığında HIF-1 α ve HIF-2 α mRNA ekspresyonlarının tümör dokusunda daha fazla olduğu saptanmıştır, ancak bizim çalışmamızda tümör ve normal dokular arasında HIF-2 α mRNA ekspresyonu bakımından anlamlı bir fark saptanmamıştır⁹⁷.

Küçük hücre dışı akciğer kanseri ile yapılan bir çalışmada bizim sonuçlarımızla benzer şekilde HIF-1 α tümör dokusunda, komşu normal dokuya göre daha yüksek bulunmuş, çalışma sonucunda HIF-1 α mRNA seviyesinin küçük hücre dışı akciğer kanserinde hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu ve terapötik ajan ya da hastalık belirteci olabileceği vurgulanmıştır⁹⁸.

Mide kanserinde yapılan bir çalışmada HIF-1 α ve VEGF mRNA seviyelerinin normal doku ve primer tümör dokusunu peritoneal metastaz dokuları ile karşılaştırıldığında, peritoneal metastaz dokularında daha yüksek olduğu, primer tümör dokusu ve normal dokuların ise bizim sonuçlarımızdan farklı olarak, benzer ekspresyona sahip olduğu saptanmıştır⁹⁹.

Lenf nodu metastazı ile farklı organlara olan metastaz ve normal kolon dokusunda HIF-1 α , CXCR4 ve VEGF mRNA ekspresyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada CXCR4 ve VEGF ekspresyonları, tümör dokularında daha yüksek saptanırken, bizim çalışmamızdan farklı olarak HIF-1 α ekspresyonu gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir¹⁰⁰.

Çalışmamızın sonuçlarına göre larinks kanserinde HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın etkili olabileceği düşünülmektedir ancak literatür bilgilerine baktığımızda HIF'lerin genel olarak post transkripsiyonl seviyede düzenlendiği görülmektedir. Dolayısı ile ileride yapılacak çalışmalarda mRNA ile protein miktarlarının da belirlenmesi daha kesin sonuçlara varılmasını sağlayacaktır.

5.3. SOX2

SOX2 araştırmaları, kök hücre devamlılığı, hücre soyunun kaderinin belirlenmesi ve somatik hücrelerin pluripotensiye dönebilmesi için gerekli faktör olması alanında yoğunlaşmasına rağmen, hastalıklarda SOX2 değişimlerinin gelişimsel anomalilere (SOX2 heterozigot mutasyonu otozomal dominant geçişli AEG sendromuna neden olmaktadır) neden olduğu gösterilmiştir. Gelişimsel hastalıkların yanında yapılan araştırmalar da SOX2'nin kanserle ilişkili olduğunu da gösterilmiştir⁵².

Çalışmamızda 26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında SOX2 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında normal doku ile tümörlü doku arasında istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$, $p = 0.095$, $t = -1.739$). Çalışmada ileri tümör evresi ve glottik bölgede bulunma ile SOX2 ekspresyonu anlamlı bulunsa da grade, yaş ve tümör çapı bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların büyük bir kısmında SOX2 mRNA ekspresyonunun, bizim verilerimizden farklı olarak, farklı kanser türlerinde, tümör dokularında sağlıklı dokuya göre arttığı saptanmıştır.

Lundberg ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; kolorektal kanserinde SOX2'nin, bağırsak hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan CDX2 ana düzenleyici genin ekspresyonunu etkilediği, SOX2 ekspresyonunun, azalmış CDX2 ekspresyonlu insan kolorektal kanserinde kök hücre durumunu indüklediği, CDX2'nin azalan ekspresyonunun kolorektal kanserli hastalarda kötü prognozla sonuçlandığı, SOX2'nin

prognostik öneminin CDX2'nin azalan ekspresyonu aracılığı ile sağladığı düşünülmektedir¹⁰¹.

Kolorektal kanser hastalarıyla yapılan bir başka çalışmada; 441 kolorektal kanser hastasının %11'inde immunohistokimyasal olarak SOX2 ekspresyonu saptanmış, BRAF^{V600E} mutasyonuna sahip örneklerde SOX2 ekspresyonunun pozitif olmasının hastalarda düşük sağ kalımla ilişkili olduğu bulunmuştur. Karaciğer metastazı yapmış kolorektal kanserlerinde SOX2 ekspresyonuna bakıldığında metastaz yapmış kolorektal dokularında ve karaciğer dokularında SOX2 ekspresyonu pozitif bulunmuş, SOX2 artmış ekspresyonuna sahip hücrelerde karaciğer metastazı ile korelasyon gösteren FGFR1 ekspresyonunun da arttığı gözlenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre SOX2 ekspresyonunun BRAF sinyali ile düzenlendiği ve artan SOX2 ekspresyonunun kolorektal kanserlerde karaciğer metastazına ve kötü prognoza neden olabileceği belirtilmiştir¹⁰².

Chou ve arkadaşlarının akciğer kanserinde yaptıkları çalışmada; SOX2'nin akciğer kanserinde eksprese olduğu, proliferasyon, survival ve ilaç direncinin SOX2 sinyaline bağlı olduğu gösterilmiştir. SOX2'nin artan ekspresyonunun akciğer kanser hücrelerinde onkojenik fenotipi desteklediği, SOX2'nin susturulması ile hücre proliferasyonunun yavaşladığı gözlenmiştir. Ayrıca SOX2'nin epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ekspresyonunu arttırdığı, EGFR aktivasyonunun da pozitif geri bildirim mekanizması ile SOX2 ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. SOX2'nin susturulmasının mitokondri fonksiyonunu değiştirerek apoptoz ve otofajiye neden olduğu da belirtilmektedir¹⁰³.

Ying ve arkadaşlarının 127 akciğer kanser hastasıyla yaptığı çalışmada ise, SOX2'nin NSCLC dokularının %35.4'ünde para-karsinom dokuya göre daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir. SOX2 ekspresyon seviyesinin cinsiyet, yaş, sigara ve TNM sınıflandırılmasıyla ilişkili olmadığı ancak kanserin patolojik tipiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Sağ kalım analizinde ise SOX2 ekspresyonu yüksek hastalarda, SOX2 ekspresyonu düşük hastalara göre prognoz daha iyi olduğu gösterilmiştir¹⁰⁴.

SOX2 ekspresyonu ile sindirim sistemi kanserlerinde (özafagus, mide, kolorektal kanserler), hastalıksız sağkalım ve klinopatolojik parametreler arasındaki ilişkinin araştırıldığı meta analizinde yüksek SOX2 ekspresyonu ile özellikle özafagus, kolorektal ve sindirim kanalı adenokarsinomunda düşük hastalıksız sağ kalımla anlamlı

bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca yüksek SOX2 ekspresyonunun özafagus ve kolorektal kanserlerinde vasküler invazyon ve zayıf farklılaşma ile korelasyon gösterdiği saptanmış, SOX2'nin sindirim sistemi kanserleri için yeni bir prognostik faktör olabileceği belirtilmektedir¹⁰⁵.

Endometrial kanserler ile yapılan bir çalışmada SOX2 eksprese eden hücre serilerinde SOX2'nin p21 promotoruna bağlanarak p21 ekspresyonunu düzenlediği, SOX2 ekspresyonunun grade ve kötü prognozla korelasyon gösterdiği saptanmıştır. İlerlemiş endometrial kanser hastalarında düşük p21 ve yüksek SOX2 ekspresyon birlikteliğinin hastalık için istenmeyen bir sonuç olduğunu dolayısı ile endometrial kanser hastalarında p21 ve SOX2 ekspresyonunun prognoz açısından kullanışlı bir biomarker olabileceği belirtilmiştir¹⁰⁶.

Finicelli ve arkadaşlarının meme kanserinde yaptığı bir çalışmada NANOG, GDF3 ve SOX2, grade II, lenf nodu negatif durum ile anlamlı derecede korelasyon göstermiş, ayrıca SOX'nin artmış nüks riski, lenf nodu durumu ve tümör-boyutu ile ilişkili olduğu saptanmıştır¹⁰⁷.

Meme kanseri ile yapılan bir başka çalışmada; SOX2 ve Aldehit Dehidrojenaz-1 (ALDH1) pozitif hastalarda SOX2 ve ALDH1 negatif olanlara göre hastalısız sağ kalım ve tam sağ kalım oranları anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. Ayrıca östrojen reseptör (ER)-negatif hastalarda da benzer bir eğilim saptanmıştır. Araştırmacıların sonuçlarına göre SOX2 ve ALDH1'in özellikle ER-negatif hastalarda kötü prognoz belirteci olabileceği düşünülmektedir¹⁰⁸.

Ye ve arkadaşlarının yumurtalık kanseri ile yaptığı çalışmada, normal ovaryum epitelinin %55.81'inde, seröz ve musinöz kist adenomların %65'inde, sınır seröz ve musinöz kist adenomların %70'inde ve seröz ve musinöz kist adenokarsinomların %91'inde SOX2 ekspresyonu saptanmış, normal ovaryum epiteli ve tüm karsinomlar karşılaştırıldığında SOX2 ekspresyonunda anlamlı derecede farklılık olduğu saptanmıştır. Ayrıca SOX2 ekspresyonundaki artışın benign, sınır ve malign tümörler şeklinde olduğu, bu durumda SOX2 proteinin seröz ve musinöz ovaryum epitel karsinomunun gelişiminde artmış olduğu gösterilmiştir¹⁰⁹.

Pham ve arkadaşlarının yumurtalık kanseri ile yaptığı bir başka çalışmada, çalışılan histolojik doku tipleri arasında fark olmaksızın 215 örneğin %60.5'inde, özellikle ileri evredeki (high grade) tümörlerde SOX2 ekspresyonu gözlenmiştir¹¹⁰.

Yang ve arkadaşlarının SOX2 ekspresyonunu immunohistokimyasal olarak araştırdığı, 55 servikal kanser ve 20 normal serviks dokusu ile yaptığı çalışmada, kanserli örneklerin %74.5'inin, normal örneklerin ise %20'sinin SOX2 pozitif ekspresyonuna sahip olduğu ancak SOX2 ekspresyonu ile klinik faktörler arasında bir korelasyon gözlenmediği saptanmış, dolayısı ile SOX2'nin servikal skuamöz hücre karsinomunda önemli olabileceği ancak klinik faktörler ve prognozla ilişkili olmadığı belirtilmiştir¹¹¹.

Annovazzi ve arkadaşlarının gliomalar ile yaptığı çalışmada, SOX2 ekspresyonu ile gliomaların malignite grade'i arasında pozitif korelasyon olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada, glioblastomların %14'ünde SOX2 gen amplifikasyonunu bulunmuş, buna karşın nöronal tümörlerde SOX2 ekspresyonu gözlenmemiş, medullablastomların ise nöronal farklılaşma durumuna göre ekspresyon miktarının değiştiği saptanmıştır. Bu durumun da SOX2'nin farklılaşmamış ve çoğalan hücreler için bir belirteç olduğu belirtilmiştir¹¹².

Oral kanserlerde SOX2'nin rolünün araştırıldığı bir çalışmada, SOX2 mRNA ve proteininin oral kanser hücre serilerinde kanser olmayan normal oral epitel hücre serisine göre arttığı saptanmıştır. Hastalardan alınan sağlıklı ve tümör dokusu karşılaştırıldığında tümör dokularında SOX2 ekspresyonunun arttığı gözlenmiş, benzer artış lokal tümörlerle karşılaştırıldığında lenf nodu metastazı yapmış dokularda da saptanmıştır. Hücre kültür çalışmaları sonucunda SOX2 ekspresyonunun azalmasının, oral kanser kök hücrelerinin proliferasyon, kendini yenileme ve tümörjenik özelliklerini azalttığı, oral kanser hücrelerinde SOX2'nin hedeflenmesinin tedaviye duyarlılığı arttırdığı ve mezenşimal benzeri belirteçlerin ekspresyonunu azaltırken, epitelyal protein ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır¹¹³.

Hepatoselüler karsinom ile yapılan bir çalışmada, artan SOX2 ekspresyonunun metastaz ve azalan sağ kalımla ilişkili olduğu saptanmış, aynı zamanda SOX2 ekspresyonu yüksek olan hücrelerde epitelyal mezenşimal değişimin de yüksek olduğu belirlenmiştir¹¹⁴.

Villanueva ve arkadaşlarının pankreas kanseriyle yaptıkları çalışmada, SOX2'nin normal pankreatik dokularda eksprese olmadığı ancak 217 pankreatik kanser dokusunun %19.3'ünde ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Pankreatik kanser hücrelerinde SOX2 ekspresyonunun susturulmasının p21 ve p27 indüksiyonu ile hücre

döngüsünü durdururarak hücre büyümesinin inhibisyonuna, SOX2 artan ekspresyonunun ise S-fazına girişi arttırmasına ve siklin D3 indüksiyonu ile hücre proliferasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca SOX2 ekspresyonunun ALDH1, ESA ve CD44 gibi pankreatik kanser kök hücre belirteçlerinin artışıyla ilişkili olduğu, bununla birlikte SOX2'nin Snail, Slug ve Twist promotorlarına bağlanarak E-caderin kaybına yol açtığı belirtilmektedir¹¹⁵.

SOX2 ekspresyonunun retinoblastoma dokularında ve periferal kanda ekspresyonunun araştırıldığı bir çalışmada, SOX2 protein ekspresyonunun Rb dokularında normal dokuya göre daha yüksek olduğu, zayıf farklılaşmış (grade III) grupta, farklılaşmış (grade I) gruptan daha yüksek olduğu aynı zamanda hasta çocukların periferal kanındaki ekspresyonunun da daha fazla olduğu saptanmıştır. Çalışmada SOX2 protein ekspresyonu ile Rb gelişimi ve invazyonu arasında bir korelasyon bulunmuştur¹¹⁷.

Bizim çalışmamızda, SOX2 mRNA ekspresyonunun, larinks tümör dokusu ve normal doku arasında anlamlı bir farklılık göstermediğini belirlendi. Yapılan çalışmalarda mide kanserinde de SOX2 ekspresyonu ile ilgili çelişkili sonuçlar olduğu görülmüştür¹¹⁸⁻¹²¹.

Mide kanseri ve SOX2 ilişkisini araştıran bir çalışmada, 10 insan mide kanser hücre serisi ile normal mide mukozası karşılaştırıldığında, hücre serilerinin 7 tanesinde SOX2 ekspresyonu ya çok düşük miktarda saptanmış ya da saptanamamıştır. Primer mide kanseri ve komşu normal doku örneklerinde SOX2 ekspresyonuna bakıldığında, 13 örneğin 6 tanesinde SOX2 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Çalışmada 12 primer kanser dokusunda SOX2 hipermetilasyonu gözlenirken, 24 kanser olmayan dokuda hipermetilasyon gözlenmediğinden SOX2 ekspresyonundaki azalmadan sorumlu mekanizmalardan birinin hipermetilasyon olabileceği belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca ekzojen SOX2 ekspresyonunun hücre döngüsü aresti ve apoptoz aracılığı ile hücre büyümesini inhibe ettiği dolayısı ile mide kanserinde tümör supresör etkisi olabileceği belirtilmiştir¹¹⁸.

Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da SOX2 ekspresyonunun mide kanseri dokularında, normal dokuya göre azaldığı, kanser dokusunda yüksek SOX2 ekspresyonuna sahip hastalarda lenf nodu metastazının daha az ve tedavinin daha iyi olduğu saptanmıştır. SOX2'nin mide kanserinde p21 ekspresyonunu arttırarak hücre

migrasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği dolayısı ile de yüksek SOX2 ve p21 ekspresyonuna sahip mide kanseri hastalarında daha az lenf nodu metastazı ve daha iyi hastalıksız sağkalım olduğu saptanmıştır¹¹⁹.

Matsuoka ve arkadaşlarının mide kanseri dokularıyla yaptıkları çalışmada ise 290 örneğin %55'inde SOX2, % 44'ünde OCT4, %10'unda NANOG pozitif ekspresyonu saptanmıştır. SOX2 pozitif veya OCT4 negatif olma durumu ile invazyon derinliği, lenf nodu metastazı veya lenfatik invazyonu arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. SOX2 pozitif ya da OCT4 negatif olan hastaların prognozunun SOX2 negatif ya da OCT4 pozitif olanlara göre daha kötü olduğu saptanmıştır¹²⁰.

Bir diğer mide kanseri ile yapılan başka bir çalışmada ise 122 mide kanser örneğinin %42'sinde SOX2 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak saptanmış ve kötü prognozla ilişkili bulunmuştur¹²¹.

Çalışmamızda larinks kanserli hastasının tümör ve normal dokularında SOX2 gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 9 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı 6 hastada ekspresyonun normal olduğu, 11 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmış olduğundan SOX2 geni promotor bölgesinin metilasyon durumunun mekanizmayı anlamaya yardımcı olabileceği düşüncesiyle araştırılması gerekmektedir.

5.4. OCT4

Embryonik kök hücre kimliğinin devam edebilmesi için gerekli faktörlerden olan OCT4 ekspresyonundaki değişimler farklılaşmayı tetikler, ektodermal, endodermal, mezodermal ve primitif hücrelere özelleşmeye yol açar. OCT4'ün doza bağımlı olarak tümör büyümesini arttırdığı ve farklı insan tümörlerinde eksprese olduğu gösterilmiştir⁷³.

Bizim yaptığımız bu çalışmada, 26 larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında OCT4 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu belirlendi ($p < 0.05$, $p = 0.006$, $t = -3.012$). Çeşitli araştırmalarda bizim çalışmamızla benzer olarak, farklı kanser türlerinin tümör dokularında OCT4 ekspresyonunun sağlıklı dokuya göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda OCT4 ekspresyonunun T3-T4 tümörlerde T1-T2'ye göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Çalışmamızda OCT4 ekspresyonu ile tümör evresi ve tümör yeri arasında da anlamlı bir ilişki bulunurken, yaş ve tümör çapı arasında bir ilişki saptanamadı.

Kim ve arkadaşlarının serviks kanseri ile yaptıkları çalışmada OCT4 ve SOX2 ekspresyonlarının, normal serviks ile karşılaştırıldığında pre-malign ve malign serviks tümörlerinde artmış olduğu saptanmış, OCT4 ekspresyonunun bilinen prognostik faktörler hariç kötü sağkalımla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. OCT4 ve SOX2'nin birlikte ekspresyonu pre-malign lezyonlarda görülmüş ancak malign serviks tümörleri ile ilişki göstermemiştir. OCT4'ün artan ekspresyonu zayıf hastalıklı sağkalım ve zayıf tam sağkalımla ilişkili bulunurken, SOX2'nin artan ekspresyonu serviks kanserli hastalarda tam sağkalımda avantajlı bulunmuştur. Yapılan çalışma sonuçlarına göre OCT4 kötü prognozla ilişkilendirilirken, SOX2'nin olumlu prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda OCT4 ekspresyonunun T3-T4 tümörler de T1-T2'ye göre daha yüksek olduğunu belirlendi¹²²

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada OCT4 protein ekspresyonunun normal serviksten, serviks kanseri ve invaziv serviks kanserine doğru dereceli olarak artış gösterdiği gözlenmiştir. OCT4'ün artan ekspresyonunun serviks kanser hücrelerinde karsinogenezi arttırdığı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. mir125b'nin artan ekspresyonunun, apoptoz ve pro apoptotik BAK1 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. OCT4'ün miR-125b'nin promotoruna bağlanarak ekspresyonunu arttırdığı, bu şekilde apoptozu ve BAK1 ekspresyonunu baskıladığı saptanmıştır¹²³.

OCT4 ve Nanog ekspresyonunun meme kanserindeki rolünün araştırıldığı bir çalışmada 126 örneğin %41.27'sinde OCT4 pozitif, % 36.51'inde NANOG pozitif, %20'sinde ise her iki proteinin de pozitif ekspresyonu gözlenmiştir. OCT4 ve NANOG ekspresyon seviyeleri hastanın yaşı ya da tümörün klinik aşaması ile ilişkilendirilemezken, tümör boyutu, grade, lenf nodu metastaz durumu ve meme kanseri moleküler alt tipi arasında pozitif ilişki saptanmıştır¹²⁴. Bizim çalışmamızda ise OCT4 ekspresyonu ile TNM evresi, tümör yeri ve grade arasında bir ilişki saptanırken, yaş ve tümör çapı ile bir ilişki bulunamamıştır.

Chiou ve arkadaşlarının akciğer kanseri ile yaptığı çalışmada, akciğer adenokarsinomlu hastalarda OCT4 ve NANOG ekspresyonlarının arttığını ve birlikte eksprese olduklarını saptamışlardır. A549 hücrelerinde ektopik OCT4 ve NANOG ekspresyonlarının hücreleri mezenşimal tip fenotipe çevirdiği, mezenşimal belirteçleri

arttırırken, epitelyal belirteçleri azalttığı ve kanser hücrelerinin malign fenotipini güçlendirdiğini bulmuşlardır¹²⁵. Biz de çalışmamızda tümör dokularında NANOG ile OCT4 arasında istatistiksel olarak önemli olan pozitif bir korelasyon olduğunu belirledik ($p=0.07$, $r=0.423$).

Akciğer kanseri ile yapılan farklı bir çalışmada ise 113 primer küçük hücre dışı kanser örneğinin %90'ında OCT4 ekspresyonu saptanmış, ekspresyonun zayıf farklılaşma ve adenokarsinom histolojisi ile pozitif olarak korelasyon gösterdiği bulunmuş ancak lenf nodu metastazı veya TNM derecelenmesi ile ilişkisi saptanmamıştır¹²⁶. Bizim çalışmamızda OCT4 ekspresyonu, bu çalışma ile uyumlu olarak orta derecede farklılaşmış (grade II) olan örneklerde, iyi farklılaşmış (grade I) olanlara göre daha yüksek saptanmış, ancak bu çalışmada TNM derecelendirilmesi ile ilişki saptanamazken bizim çalışmamızda T3-T4 ileri evre tümörlerde, T1-T2 erken evre tümörlere göre ekspresyonun daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Akciğer kanseri ile yapılan başka bir çalışmada; 112 normal dokunun %21'inde OCT4 ekspresyonu saptanmış, çalışmaya dahil edilen 70 adenokarsinomun %62.3'ünde OCT4 negatif, %27.3 zayıf pozitif ve %9.1'inde güçlü pozitif ekspresyon gösterirken, 90 yassı hücre karsinomundan %74.4'ünde OCT4 negatif, %25.6'sında zayıf pozitif ekspresyon göstermiştir. OCT4 ekspresyonu T3-T4 yassı hücre karsinomlarında daha fazla olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır¹²⁷. Bizim çalışmamızda ise yassı hücre karsinomlu tümör dokularında normal dokuya göre OCT4 ekspresyonu daha yüksek bulunmuş, ayrıca T3-T4 evresi ile OCT4 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır.

Mide kanseri ile yapılan bir çalışmada 80 normal dokunun %32.5'inde OCT4 ekspresyonu saptanmıştır. Çalışmada kullanılan 412 kanser dokusunun %75.2'sinde OCT4 eksprese olmuş, %61.17'sinde yüksek ekspresyon saptanmıştır. OCT4 ekspresyonunun yaş, farklılaşma, invazyon, lenf nodu metastazı ve TNM sınıflandırılmasıyla ilişkili olduğu, ancak cinsiyet ve histolojik tiple korelasyon göstermediği saptanmıştır. Ayrıca yüksek OCT4 ekspresyonu gösteren hastaların 5 yıllık sağkalım oranı düşük ekspresyona sahip olanlardan daha düşük bulunmuştur¹²⁸. Bizim çalışmamızda ise TNM evresi, tümör bölgesi ve grade ile OCT4 ekspresyonu arasında bir ilişki saptanırken, yaş ve tümör çapı ile ilişki saptanamamıştır.

Nazofarengal kanserlerle yapılan bir çalışmada SOX2, OCT4 ve NANOG genlerinin tümör olmayan doku ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda yüksek seviyede eksprese olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu proteinlerin çeşitli klinopatolojik faktörler ve epitelyal mezenşimal transisyon ilişkili indikatörlerle de korelasyon gösterdiği saptanmıştır. OCT4 ve NANOG'un artmış ekspresyonu kötü sağ kalımla ilişkili ve güçlü bağımsız prognostik etkiye sahiptir. OCT4 ve NANOG, sonuçlarımızla uyumlu olarak TNM sınıflandırması ve klinik aşama gibi agresif davranışlarla korelasyon göstermektedir. Bu çalışmaya göre embriyonik kök hücre belirteçleri olan OCT4 ve NANOG nazofarengal kanseri için bağımsız prognostik faktörler olabileceği düşünülmektedir¹²⁹.

Bu konuda yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde oral kanser çalışmalarında çelişkili sonuçlar olduğu görülmektedir.

Oral kanserlerle yapılan bir çalışmada SOX2, OCT4 ve NANOG protein ekspresyonlarının, tümör, tümöre komşu normal doku ve normal doku arasında önemli farklılık gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacıların sonuçlarına göre, bizim bulgularımızdan farklı olarak OCT4 ekspresyonu tümöre komşu normal doku ve normal dokuda, tümör dokusuna göre daha fazladır. SOX2 ekspresyonu ise tümöre komşu normal dokuda, tümör ve normal dokuya göre daha fazladır¹³⁰. Biz de çalışmamızda OCT4 ekspresyonu bakımından tümör ve normal dokular arasında anlamlı bir fark olduğunu belirledik. NANOG ekspresyonu ise tümör ve tümöre komşu normal dokuda, normal dokuya göre daha fazla bulunmuş ancak NANOG ekspresyonu açısından tümör ve tümöre komşu normal dokuda anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Biz NANOG ekspresyonunu tümör dokularında normal dokuya göre anlamlı derecede daha yüksek bulduk. OCT4 ve SOX2'nin yüksek ekspresyonu, erken AJCC derecesi, küçük tümör büyüklüğü ve lenf nodu metastazı olmamasıyla ilişkilendirilmiştir. NANOG ekspresyonu ise klinopatolojik parametrelerin hiç biriyle korelasyon göstermemiştir¹³⁰.

Oral kanserle yapılan başka bir çalışmada OCT4 ekspresyonu oral yassı hücre karsinomu, oral epitelyal displazi ve normal oral mukoza dokularında araştırılmış, bizim sonuçlarımızdan farklı olarak OCT4 ekspresyonunun normal oral epitelde, diğer dokulara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır¹³¹. Yine oral kanserle yapılan bir diğer çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak aynı hastadan alınan tümör örneklerinde OCT4 ekspresyonunun normal dokuya göre artmış olduğu saptanmıştır. Ayrıca lokal

tümörle karşılaştırıldığında metastatik lenf nodu olanlarda OCT4'ün arttığı saptanmıştır. Ayrıca hücre kültür çalışmalarında artan OCT4 ekspresyonunun, hücrelerin proliferatif aktivitesini, invazyon yeteneğini arttırdığı saptanmıştır¹³².

Bizim sonuçlarımıza göre OCT4'ün larinks kanser patogeneze katkıda bulunan genlerden biri olabileceğini düşünmekteyiz.

5.5. NANOG

Embriyonik kök hücrelerde NANOG proteini; OCT4, SOX2, LIN28 gibi transkripsiyon faktörleri birlikte pluripotensi ve farklılaşma arasındaki dengeyi sağlar. Kanser hücrelerinde, özellikle malign ve zayıf farklılaşmış (high grade) olanlarda NANOG genelde fazla miktarda eksprese olur. Anormal ya da bozulmuş NANOG ekspresyonu hücreyi yeniden programlama benzeri sürece sokar. Ancak hücreleri kök hücre durumunda tutamaz ve hücrede tümör oluşumuna neden olan çeşitli sinyallerin artmasıyla sonuçlanır⁶⁶.

Larinks kanseri olan 26 hastanın tümör ve normal dokularında NANOG gen ekspresyonu karşılaştırıldığında tümörlü doku ile normal doku arasında NANOG ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğunu belirledik ($p < 0.05$, $p = 0.026$, $t = -2.386$). Çalışmamızda NANOG ekspresyonu ile TNM evresi arasında ilişkili bulunurken, tümör bölgesi, grade, yaş ve tümör çapı ile ilişki saptanmamıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak normal doku ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda NANOG ekspresyonunun arttığı görülmektedir.

Ovaryan seröz karsinomu ile yapılan bir çalışmada NANOG mRNA ekspresyonunun farklı ovaryum kanser hücre serilerinde değişkenlik gösterdiği, paksitel dirençli SKOV3 hücrelerinde SKOV3 hücrelerine göre arttığı gözlenmiştir. 74 ovaryum seröz karsinoma dokularının %21.6'sında NANOG ekspresyonu pozitif olarak saptanırken, ovaryumun benign tümörleri olan seröz kistadenom dokularının hiç birinde saptanmamıştır. Bu çalışmada pozitif NANOG ekspresyonuna sahip hastaların tam sağkalımının negatif olanlara göre daha kısa olduğu belirlenmiştir¹³³.

NANOG'un yumurtalık kanserindeki rolünün araştırıldığı başka bir çalışmada, benign yumurtalık lezyonları ile karşılaştırıldığında kanser dokularında bizim çalışmamızla uyumlu olarak NANOG mRNA ve protein miktarının arttığı görülmüştür.

Nükleer NANOG ekspresyonunun artışı zayıf farklılaşmış (high grade) kanserlerle istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, NANOG'un tam sağ kalım ve hastalıksız sağ kalım bakımından bağımsız prognostik faktör olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca NANOG ekspresyonunun, metastaz özelliğine sahip hücre serilerinde ve metastatik odağa sahip örneklerde yüksek derecede eksprese olduğu gözlenmiştir. Hücre serilerinde NANOG'un stabil olarak susturulması (knock down) edilmesi, hücrelerde E-caderin, Caveolin-1, FOXO1, FOXO3a, FOXOJ1 ve FOXOB1 gibi genlerin mRNA ekspresyonunu arttırarak, proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu engellediği bulunmuştur. NANOG ekspresyonunun ektopik olarak arttırılması ise bu genlerin ekspresyonunu azaltarak hücre göçünü ve invazyonunu arttırdığı belirtilmiştir¹³⁴.

Pankreas kanserinde yapılan çalışmada çalışmamızla uyumlu olarak OCT4 ve NANOG ekspresyonunun, tümör dokusunda, komşu normal dokuya göre daha yüksek olduğu 43 örneğin %48.8'inde OCT4, %53.5'inde NANOG ekspresyonun fazla olduğu saptanmıştır. Tam sağ kalım açısından değerlendirildiğinde OCT4/NANOG yüksek ekspresyona sahip grubun düşük gruba göre daha kötü bulunmuştur. Sonuçlara göre OCT4 ve NANOG'un yüksek ekspresyonu, bu genlerin pankreas karsinogenezinin erken aşaması ile ilişkili olabileceğini göstermektedir¹³⁵.

Gliomada NANOG'un rolünün araştırıldığı bir çalışmada 69 glioma örneğinin, zayıf farklılaşmış olanlarında (high-grade) NANOG mRNA ekspresyonunun, iyi farklılaşmış (low grade) olanlara göre daha yüksek olduğu saptanmış, ayrıca NANOG ekspresyonu ile patolojik grade arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 7 normal beyin dokusunda ise ekspresyon saptanmamıştır¹³⁶. Bizim çalışmamızda NANOG ekspresyonunu tümör dokusunda normal dokuya göre daha fazla bulmamıza rağmen, hastalık evresi ile arasında bir ilişki saptanamadı.

Xu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 360 kolorektal kanser dokusunun %20'sinde NANOG ekspresyonu saptanmış ve NANOG ekspresyonunun, grade, lenf nodu metastazı, TNM evresi ve karaciğer metastazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur¹³⁷. Bizim çalışmamızda NANOG ekspresyonu ile ilerlemiş TNM evresi arasında bir ilişki bulunurken, diğer klinopatolojik özellikler arasında bir ilişki saptanamamıştır.

Kolorektal kanserle yapılan bir çalışmada 8 taze tümör ve normal doku örneğinde NANOG protein ekspresyonunun tümör dokularında normal dokuya göre

daha fazla olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada 175 parafine gömülü örnek kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamada örneklerin 140 tanesinde düşük, 35 tanesinde yüksek NANOG ekspresyonu saptanmıştır. Bizim çalışmamızla uyumlu olarak NANOG ekspresyonu ile, yaş, cinsiyet, tümör boyutu, tümör bölgesi, farklılaşma ve invazyon arasında anlamlı bir ilişki saptanmamasına rağmen, NANOG ekspresyonunun lenf nodu metastazı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir¹³⁸.

Akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada, verilerimizle uyumlu olarak NANOG mRNA ekspresyonunun tümör dokularında, normal dokulardan daha fazla eksprese olduğu saptanmış, 123 tümör doku örneğinin 98 (%79.7) tanesinde, 123 normal doku örneğinin ise 34 (%27.6) tanesinde NANOG proteininin yüksek ekspresyonu saptanmıştır. Çalışmada NANOG ekspresyonu ile TNM evresi ve hücre farklılaşması arasında pozitif korelasyon saptanırken, yaş, cinsiyet ve lenf nodu metastazı arasında korelasyon bulunamamıştır¹³⁹. Biz ise çalışmamızda NANOG ekspresyonunun sadece TNM evresi ile ilişkili olduğunu saptayabildik.

Yin ve arkadaşlarının hepatoselüler kanserde yaptıkları çalışmada 228 hastanın 88'inde (%38.6) OCT4 ve 72'sinde (%31.6) NANOG pozitif ekspresyona sahiptir. OCT4 ve NANOG'un birlikte ekspresyonu ise 31 hastada görülmüştür. OCT4 ve NANOG ekspresyonları tümör çevresindeki dokulara göre tümör dokularında daha yüksektir. Genlerin ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, hepatit B enfeksiyonu, tümör boyutu, vasküler invazyon, TNM evresi arasında bir ilişki saptanmamıştır. Ancak OCT4 ve NANOG'un birlikte ekspresyonu büyük tümör boyutu ve vasküler invazyon ile anlamlı ilişki göstermiştir¹⁴⁰. Biz de çalışmamızda tümör dokularında OCT4 ve NANOG'un istatistiksel olarak anlamlı eksprese olduğunu belirledik.

Meme kanseri dokularında c-MYC, KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 genlerinin ekspresyonlarının araştırıldığı bir çalışmada bizim sonuçlarımızdan farklı olarak kanser örneklerinde OCT4 ve NANOG zayıf ekspresyon gösterirken, c-MYC ve KLF4 güçlü ekspresyona sahiptir. Tümör örnekleri TNM durumlarına göre sınıflandırıldığına, NANOG'un fazla miktarda eksprese olduğu örnekler tümör progresyonunun erken safhalarına denk gelmektedir ancak TNM aşaması ve NANOG arasında bir ilişki saptanamamıştır⁽¹⁴¹⁾. Bizim çalışmamızda ise NANOG ekspresyonu TNM evresi geç olan dokularda daha fazla olmuştur. Sonuçlarımıza göre NANOG geninin larinks kanser patogenezeine katkıda bulunan genlerden biri olabileceğini düşündürmektedir.

5.6. CD133

CD133 insan hematopoietik kök hücre ve fare nöroepitelyal hücrelerinde saptanmış pentaspan (membranı 5 kez geçen) transmembran proteinidir. Birçok çalışma da bu proteinin ekspresyonunun, progenitör/kök hücre, tümör, rejenerasyon, farklılaşma ve metabolizma ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. CD133 kök hücrelerden izole edilen anahtar biomarkerlerden biridir, ancak son çalışmalar sadece biomarker olarak değil, hücre büyümesi, gelişim ve tümör biyolojisinde de görevli olduğunu göstermektedir⁷⁷.

Larinks kanseri 26 hastanın tümör ve normal dokularında CD133 gen ekspresyonunun karşılaştırıldığı çalışmamızda normal doku ile tümörlü doku arasında CD133 ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$, $p=0.304$, $t=-1.050$). Ancak CD133 ekspresyonunun hastalığın klinopatolojik özellikleri ile korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak hepatoselüler karsinomlu hastalarda yapılan bir çalışmada tümöre komşu normal karaciğer dokusundan alınan örneklerle karşılaştırıldığında CD133 protein ekspresyonunun hem sitoplazmik hem de nükleer olarak tümör dokularında daha fazla olduğu, sitoplazmik CD133 ekspresyonunun kötü prognoz, nükleer CD133 ekspresyonunun ise iyi prognozla ilişkili olduğu saptanmıştır¹⁴².

Akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada CD133 protein ekspresyonunun tümörlü dokuların sitoplazma ve nükleusunda, normal dokuya göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Kanser nükleusundaki CD133 ekspresyonu bizim sonucumuzla uyumlu olarak tümör çapı, farklılaşma ve TNM evresi ile ilişkili bulunmuştur¹⁴³.

Kolorektal kanserde CD133 ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak saptandığı bir çalışmada, 210 vakanın 130 tanesinde (%61.9) pozitif ekspresyon verirken, 80 vaka (%38.1) ekspresyon göstermemiştir. Çalışmada CD133 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümör büyüklüğü, tümör bölgesi, farklılaşma arasında bir ilişki bulunamazken, lenfatik ve hepatik metastaz ile anlamlı bir korelasyon saptanmıştır¹⁴⁴. Bizim çalışmamızda ise CD133 mRNA ekspresyonu bakımından tümörle normal doku arasında anlamlı bir farklılık saptanamadı.

2015 yılında farklı hücre serilerinde yapılan bir çalışmada p53'ün CD133 promotörüne direk olarak bağlanması ile p53'ün CD133 transkripsiyonunu baskıladığı saptanmış, CD133 promotöründe p53 bağlanma bölgesi olmasının, hem p53 bağlanması için hem de CD133 promotörünün epigenetik modifikasyonu gerçekleştirecek HDAC1

toplanması için gerektiği belirtilmiş, bu kaskadın da CD133 transkripsiyonunun inhibisyonuna yol açtığı bildirilmiştir¹⁴⁵.

Bizim çalışmamızda tümör dokusu ile normal dokuyu CD133 mRNA ekspresyonunu bakımından karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark ortaya çıkmamıştır. Ancak bazı çalışmalarda larinks kanserinde p53 ekspresyonunun arttığına dair bilgiler mevcuttur^{146,147}. Çalışmamızda, CD133 ekspresyonunun 15 tümör dokusunda normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Dolayısı ile p53 ekspresyonunun bizim örneklerimizde de CD133 ekspresyonunu etkilemiş olabileceği düşünülebilir. Bu nedenle aynı örneklerde p53 ekspresyonunun da belirlenmesinin, p53 ile CD133 arasındaki ilişkinin değerlendirilmesine ve CD133 ekspresyon seviyesindeki değişimin anlamlandırılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

5.7. ESRRA

ERR'ler (Estrogen Related Receptor) HIF aracılı hipoksik cevapta önemli kofaktör olarak tanımlanmıştır. ERR'ler fonksiyonel HIF heterodimerlerini tanımaktadır⁸⁰.

Yirmi altı larinks kanseri hastasının tümör ve normal dokularında ESRRA gen ekspresyonu karşılaştırıldığında hastaların 5 tanesinde tümör dokusundaki ekspresyonun normal dokuya göre arttığı saptanmış, 5 hastada ekspresyonun normal olduğu, 8 hastada ise normal dokuya göre azaldığı saptanmıştır. Bir hastanın tümör dokusunda, 6 hastanın normal dokusunda, 1 hastanın ise hem tümör hem de normal dokusunda gen ekspresyonu tespit edilememiştir. Normal doku ile tümörlü doku arasında ESRRA ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$, $p=0.170$, $t=-1.434$). Çalışmamızda ESRRA gen ekspresyonu ile ileri TNM evresi ve tümör yeri arasında bir ilişki saptanırken, yaş, tümör çapı ve grade arasında bir ilişki saptanmamıştır.

ESRRA'nın meme, prostat, yumurtalık, kolon ve oral kanserlerde ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. 25 oral squamous hücre kanseri hastası ile yapılan bir çalışmada bizim sonuçlarımızdan farklı olarak ESRRA mRNA'sının hastaların 19'unda arttığı, 4'ünde azaldığı, 2 tanesinde ise bir değişim gözlenmediği saptanmıştır. Ayrıca mRNA seviyesinde artış bulunan örneklerin ve protein miktarında da artış gözlenmiştir. ESRRA ekspresyonundaki artışın nedenini anlamak için 25 hastanın

periferal kanı ile dokuları karşılaştırılarak genin kopya sayısı artışına bakılmış ve örneklerin 6'sında amplifikasyon saptanmıştır¹⁴⁸.

Kanserin karakteristik özelliklerinden biri tümör hücrelerinin metabolik modifikasyonudur. Bu modifikasyonlar hücre metabolizmasını değiştirerek hücrelerin olumsuz çevre şartlarında yüksek proliferasyon oranına sahip olmasını sağlamaktadır. Tiroid tümörlerinde $ERR\alpha$ ekspresyonu oksidatif mekanizma ve hücrelerin proliferasyon durumu ile ilişkilidir. 10 onkositik varyant tiroid tümör, 10 klasik foliküler tiroid tümör ve 10 normal tiroid dokusunun dahil edildiği bir çalışmada $ERR\alpha$ ekspresyonunun, bizim sonuçlarımızdan farklı olarak tümör dokularında normal dokuya göre daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır¹⁴⁹.

Oral kanserlerde ESRRA'nın ekspresyonunun artış mekanizmasını araştıran bir çalışmada mir-125a ekspresyonunun 20 OSCC (Oral Squamous Cell Cancer) örneğinin 16'sında normal dokuya göre azaldığı, ayrıca ESRRA ekspresyonunun 20 örneğin 15'inde normal dokuya göre arttığı saptanmış, 15 örneğin 11'inde düşük mir-125a yüksek ESRRA ekspresyonu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre mir-125a'nın ESRRA ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenlediği ve OSCC'de ESRRA artışında yeni bir mekanizma olabileceği gösterilmiştir¹⁵⁰.

ESRRA ekspresyonunun artması ile ilgili mekanizmalardan biri olduğu düşünülen mir-125a'nın azalan ekspresyonu larinks kanseri ile yapılan çeşitli çalışmalarda da saptanmıştır^{151,152}.

Biz çalışmamızda tümör ve normal dokularda ESRRA ekspresyonu bakımından anlamlı bir farklılık saptayamadık. Ancak literatürde ESRRA inhibisyonuna neden olduğu bildirilen miR125a mikroRNA'sının larinks kanserinde de düşük ekspresyona sahip olduğunu gösteren çalışmalar olması, örnek sayısının artırılmasının ESRRA ile larinks kanser arasındaki olası ilişkiye ışık tutabileceği düşünülmektedir.

5.8. Tümörlü Dokularda Genler Arasındaki Korelasyon

Yaptığımız çalışmada tümör dokularında HIF-2 α geni ile CD133 ($r=0.70$, $p<0.05$, $p=0.001$) ve ESRRA ($r=0.67$, $p<0.05$, $p=0.004$) genleri arasında korelasyon olduğu belirlendi. Bu konudaki makaleler incelendiğinde farklı kanser türlerinde HIF-2 α ve CD133 arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Glioma hücrelerinde, hipoksinin glioma kök hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, HIF-2 α ve çeşitli HIF'in regüle ettiği genlerin, kök hücre olmayan tümör hücresi ve nöral progenitörlerle karşılaştırıldığında tercihen glioma kök hücrelerinde eksprese olduğu gösterilmiştir. Tümör örneklerinde ise HIF-2 α 'nın kanser kök hücre belirteçleri ile birlikte lokalize olduğu saptanmıştır. Çalışmada birçok tümör hücresinde HIF-2 α ve CD133'ün birlikte eksprese olduğu gösterilmiştir¹⁵³.

Tümör hipoksisinin epitelyal mezenşimal değişimi indüklediği ve bu durumun kanser kök hücreleri ile ilişkili olduğunun düşünüldüğü bir çalışmada, pankreatik duktal karsinom hücrelerinde HIF-2 α 'nın CD133 ile birlikte eksprese olduğu gösterilmiştir¹⁵⁴.

Akciğer kanser hücrelerinin hipoksiye maruz bırakılmasıyla CD133 ekspresyonunun arttığının gösterildiği çalışmada, CD133 geninin promotorundaki P1 bölgesinin, hipoksinin indüklediği gen ekspresyonu ile ilişkili olduğu, bu bölgede OCT, SRY gibi elemanlarının bağlanma dizilerinin yer aldığı, OCT4 ve SOX2'nin bu bölgeye bağlandığı da belirtilmiştir. Hipoksinin indüklediği faktörlerin α alt ünitesinin güçlendirdiği OCT4 ve SOX2 ekspresyonunun hipoksinin indüklediği CD133 ekspresyonu için gerekli olduğu belirtilmiştir¹⁵⁵.

2013 yılında yapılan bir çalışmada CD133'ün transkripsiyonunun 5 alternatif promoter aracılığı ile gerçekleştiği, HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın, CD133'ün P5 promotor bölgesine ETS (E-twenty six) transkripsiyon faktörleri aracılığı ile EBS'ye (ETS bağlanma bölgesi) bağlanarak CD133 ekspresyonunu düzenlediği saptanmıştır¹⁵⁶.

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerden bir diğeri ise HIF-2 α ve ESRRA geni arasındaki korelasyondur. Hamidian ve arkadaşlarının nöroblastom ile yaptığı bir çalışmada HIF-2 α ekspresyonunun ESRRA tarafından düzenlendiği saptanmıştır⁹⁶.

Çalışmamızda Nanog ile OCT4 arasında istatistiksel olarak önemli olan pozitif bir korelasyon saptanmıştır (p=0.07, r=0.423) Literatür incelendiğinde hepatoselüler karsinomda^{157,158}, nazofarengal karsinomda¹²⁹, OCT4 ve NANOG'un birlikte eksprese olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Çalışmamızda CD133 ile ESRRA geni ekspresyonları arasında da pozitif yönde bir korelasyon vardır ve istatistiksel olarak önemlidir (r=0.734, p<0.05, p=0.001). Her iki genin HIF-2 α ile de korelasyon göstermesi, hipoksinin bu iki genin ekspresyonunu birlikte düzenliyor olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu iki gen arasındaki korelasyona ait bir veri bulunamamıştır.

5.9. Hipoksi- Embryonik Kök Hücre Belirteçleri

Çalışmamızda 6, 12, 24, 48 ve 72 saatlik hipoksi uygulamaları sonucunda, uygulamaların hepsinde çalışılan gen mRNA ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu belirlendi. Çalışmamızda hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133 ve ESRRA genlerinin mRNA ekspresyonlarında artış gözlenirken, FaDu hücrelerinde HIF-1 α ve SOX2 mRNA ekspresyonunda azalma, HIF-2 α , OCT4, NANOG, CD133 ve ESRRA mRNA ekspresyonlarında artma gözlenmiştir.

Hep-2 hücrelerinde hipoksi muamelesinin, embriyonik kök hücre genlerinin ekspresyonunu arttırması bu genlerin promoter bölgesine, HIF-1 α ve HIF-2 α genlerinin bağlanması ile hipoksiye cevap oluşumu şeklinde açıklanabilir. Ancak FaDu hücrelerinde HIF1 α ve SOX2 ekspresyonunun hipoksi maruziyeti ile azalması HIF ekspresyonlarının post transkripsiyonel düzenlenmesi, SOX2 azalması ise FaDu hücrelerinde SOX2 promotor metilasyonu ile ilişkili olabilir.

Prostat kanserinde hipoksinin SOX2 ve metastazla ilişkili fonksiyonlar üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada, prostat kanser hücrelerinin akut ve kronik hipoksiye maruziyeti sonrasında HIF-1 α ve HIF-2 α protein ekspresyon seviyelerinde artma gözlenirken aynı zamanda SOX2'nin de indüklendiği saptanmıştır. SOX2'nin genetik azaltılmasının, hipoksinin indüklediği hücre fonksiyonlarını azalttığı saptanmıştır. HIF-1 α 'nın susturulması, akut hipoksi aracılı hücre invazyonunun azaltırken, HIF-2 α 'nın susturulması küre oluşumunu ve kronik hipoksinin indüklediği SOX2 artışını azalttığı gözlenmiştir¹⁵⁹.

Glioblastomda kök hücre benzeri hücrelerde hipoksinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, GBM kaynaklı nöron hücre (nörosifer) kültürlerinde %1 oksijen seviyesinde, HIF-1 α protein seviyesinin ve hipoksini indüklediği gen 2, lysyl oksidaz, vasküler endotel büyüme faktörü gibi hipoksi cevap genlerini önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Hipoksi kök hücre benzeri yan popülasyonu ve CD133 eksprese eden hücre yüzdesini de arttırmıştır, Aynı zamanda NOTCH yolağı ligand ve hedeflerinin de indüklendiği saptanmıştır¹⁶⁰.

Hipoksinin yumurtalık kanseri hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, hipoksiye maruz kalan hücrelerde G₀/G₁ fazının uzadığı, çalışmamızla uyumlu olarak hücrelerin daha yüksek miktarda CD44, CD133, OCT4, SOX2 eksprese

ettiği saptanmış, yumurtalık kanseri hücrelerinin, hipoksik koşullarda kök hücre faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak, kök hücre benzeri özellikleri ile hayatta kaldığı ve tekrar yüksek oksijenli çevreye girdiklerinde daha agresif davrandıkları saptanmıştır¹⁶¹.

Mathieu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada embriyonik kök hücre ve IPSC hücreleri önce farklılaştırılmış, daha sonra hipoksik ortamda 1-2 hafta inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda her hücre serisindeki hücrelerin farklılaşmamış insan embriyonik kök hücre morfolojisine sahip olduğu belirlenmiştir. Hipoksinin indüklediği faktörlerin, kanser hücrelerinde OCT4, NANOG, SOX2 ve miR-302 gibi yeniden programlama faktörlerini düzenlediği bilinmektedir. Çalışmada hücreler farklılaştırıldıktan sonra bu genlerin ekspresyonunda azalma tespit edilmiş, aynı hücreler hipoksiye maruz bırakılıp geriye farklılaştırıldığında ise genlerin ekspresyonlarının yeniden insan embriyonik kök hücre ekspresyon seviyelerine çıktığı saptanmıştır¹⁶².

Prostat, beyin, böbrek, serviks, akciğer, kolon, karaciğer ve meme tümörünü içeren 11 kanser hücre serisinde yapılan bir çalışmada hipoksi durumunda IPSC indükleyicileri olan OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, cMYC ve miR-302 ekspresyonlarının hipoksinin indüklediği faktörler aracılığı ile indüklendiği saptanmıştır. Ayrıca primer tümörlerle yapılan deneylerde HIF ekspresyonları ve IPSC indükleyicileri arasında korelasyon saptanmıştır¹⁶³.

Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde bizim sonuçlarımızın da genel olarak literatürle uyumlu olduğu, buradan yola çıkarak da larinks kanserinde hipoksi muamelesinin embriyonik kök hücre belirteçlerinin ve ESRRA geninin ekspresyonunu arttırarak larinks kanser patogeneze katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

5.10. XCT-790 Uygulaması

XCT-790; ESRRA'nın ligand bağlanma bölgesine bağlanarak, ESRRA'nın selektif inhibisyonunu sağlayan bir kimyasaldır⁽¹⁶⁴⁾. Çalışmamızda HIF aracılı hipoksik cevapta önemli bir kofaktör olan ESRRA geninin inhibisyonu ile hipoksiye cevap olarak ekspresyonları artan embriyonik kök hücre genlerinin ekspresyonlarındaki değişimi incelemek amacıyla Hep-2 ve FaDu hücreleri farklı konsantrasyonlarda XCT-790 ile muamele edildi. Hep2 hücreleri 72 saat hipoksi uygulaması ile birlikte değişik dozlarda XCT790'a maruz bırakıldı. Gruplar arasında gen ekspresyonu asından

istatistiksel olarak fark saptanmıştır. 72 saat hipoksi maruziyeti kontrol olarak kabul edildiğinde 5 μ M XCT790'nın CD133 hariç diğer genlerin ekspresyonunun azalttığı belirlenmiştir.

FaDu hücreleri ile yaptığımız çalışmada ise hücreler 48 saat hipoksi uygulaması ile birlikte değişik dozlarda XCT790'a maruz bırakılmıştır. Gruplar arasında gen ekspresyonu açısından istatistiksel olarak fark saptanmıştır. 48 saat hipoksi maruziyeti kontrol olarak kabul edildiğinde XCT790 uygulanan dozlarda SOX2 ve OCT4 ekspresyonu azalırken, diğer genlerin ekspresyonu artmıştır.

Nöroblastoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada hücreler hipoksiye maruz bırakıldığında akut fazda (4-24h) HIF-1 α , uzamış fazlarda (48-72h) ise HIF-2 α proteini baskındır. HIF-2 α mRNA'sı proteiniyle benzerlik göstererek zaman içinde artmakta, HIF-1 α mRNA'sı ise zaman içinde azalmaktadır. HIF-2 α 'nın potansiyel regülatörlerinden biri PGC-1 β 'dir. ERR α 'nın PGC1 α/β tarafından koaktivasyonu tümörlerde anjiyogenik ve proliferatif süreçlerde rol oynamaktadır. Ayrıca meme kanserinde ERR ailesi üyelerinin de HIF'larla fiziksel olarak interaksiyon verdiği, iskelet kasında ise ERR α /PGC1 α 'nın HIF-2 α transkripsiyonunu yönlendirdiği bildirilmiştir. Nöroblastom hücreleri ERR α inhibitörü XCT790 ile muamele edildiğinde doza bağlı olarak HIF-2 α mRNA'sının azaldığı saptanmıştır⁹⁶.

Akciğer kanseri hücre serisi ile yapılan bir çalışmada A549 hücrelerinde ERR α ekspresyonu hem mRNA hem de protein olarak normal bronş epiteline göre artmıştır. Hücrelere XCT-790 uygulandığında A549 hücrelerinde proliferasyon doza bağlı olarak 24 ve 48h'da azalmıştır. SNAIL, ZEB1, TWIST ve SLUG epitelyal mezenşimal translyonda rolü olan transkripsiyon faktörleridir. A549 hücrelerinde artan ERR α ekspresyonunun bu genlerden SNAIL ve SLUG'ın mRNA ve protein ekspresyonunu arttırdığı ancak TWIST ve ZEB1 ekspresyonlarında anlamlı değişikliğe neden olmadığı saptanmıştır¹⁶⁵.

Prostat kanserinde yapılan bir çalışmada ERR α ekspresyonunun kanserde arttığı saptanmış ayrıca prognostik faktör olabileceği belirtilmiştir. Çalışmada ERR- α 'nın fazla ekspresyonu *in vitro* hipoksi ve normal fizyolojik koşullarda hücre proliferasyonunu arttırdığı saptanmıştır. XCT 790 muamelesinin ise bu etkiyi azalttığı saptanmıştır¹⁶⁶.

Adenocortikal kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada önce MCF-7 pozitif kontrol olarak kullanılarak ERR α 'nın bu hücrelerde eksprese olduğu saptanmış, daha

sonra hücreler XCT-790'nın proliferasyon üzerindeki inhibe edici etkisi gösterilmiştir¹⁶⁷.

Çalışmamızda Hep-2 hücreleri 72 saat hipoksi ve 5µM XCT790 uygulamasının, hipoksinin indüklediği gen ekspresyonunu değiştirdiği FaDu hücrelerinde, çalışılan dozlarda sadece SOX2 ve OCT4 üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bunun bir nedeni çalışmada kullandığımız XCT-790 üretici firmanın önerisi ile DMSO'da çözülmüş olması olabileceğini düşündürmektedir. DMSO'nun hücre kültüründe gen ekspresyonunu değiştirdiğine dair çalışmalar mevcuttur. Dolayısı ile bizim çalışmamızda da gen ekspresyonu üzerinde XCT790 ile birlikte farklı bir mekanizma ile etki göstermiş olabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte hipoksik cevabın oluşmasında ESRRA önemli bir kofaktördür ancak tek başına inhibe edilmesi hipoksik cevabın ortadan kaldırılmasında yeterli olmayabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Skuamöz hücreli larinks tanısı almış 26 hastanın yaş ortalaması 63,2'dir.
2. Patolojik incelemeler sonucunda histolojik grade, 14 hastada I, 11 hastada II, 1 hastada III olarak tespit edilmiştir.
3. Hastaların 9 tanesinin TNM evresi T1-T2, 16 tanesinin ise T3-T4 olarak saptanmıştır.
4. HIF-1 α , HIF-2 α , SOX2, OCT4, NANOG, CD133, ESRRA genlerinin ifadeleri bakımından tümör ve normal dokular karşılaştırıldığında HIF-1 α ($p<0,05$), OCT4 ($p<0,05$) ve NANOG ($p<0,05$) genleri için anlamlı bir farkın olduğu, HIF-2 α ($p>0,05$), SOX2 ($p>0,05$), CD133 ($p>0,05$) ve ESRRA ($p>0,05$) için anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.
5. Tümörlü dokularda; HIF-2 α geni ile CD133 ($r=0.70$, $p<0.05$, $p=0.001$) ve ESRRA ($r=0.67$, $p<0.05$, $p=0.004$) genlerinin ekspresyon değerleri arasında, CD133 ile ESRRA geni ekspresyonları arasında ($r=0.734$, $p<0.05$, $p=0.001$), NANOG ile OCT4 arasında istatistiksel olarak önemli pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($p=0.07$, $r=0.423$).
6. Çalışma grubumuzda,

- ü TNM evresi ile SOX2, OCT4, NANOG, CD133 ve ESRRA genleri,
- ü Tümör bölgesi ile HIF-2 α , SOX2, OCT4, CD133 ve ESRRA genleri,
- ü Grade (Farklılaşma Derecesi) ile OCT4 ve CD133 genleri,
- ü Tümör Çapı ile HIF-1 α , HIF-2 α ve CD133 genleri arasında bir ilişki saptanırken, yaş ile gen ekspresyonları arasında bir ilişki saptanamamıştır.

7. Çalışmamızda farklı sürelerde hipoksiye maruz bırakılan Hep-2 hücrelerinde genlerin ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gözlenmiştir.
8. Çalışmamızda Hep-2 hücrelerinde 72 saat hipoksi ve 5 μ M XCT790 uygulamasının, hipoksinin indüklediği gen ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır.

9. Çalışmamızda farklı sürelerde hipoksiye maruz bırakılan FaDu hücrelerinde genlerin ekspresyon düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklılık gözlenmiştir.
10. FaDu hücrelerinde, XCT790'nın çalışılan dozlarda sadece SOX2 ve OCT4 üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.
11. ESRRA hipoksik şartlarda HIF'lerin kofaktörlerinden biridir ancak tek başına güçlü bir etkiye sahip olmayabilir.
12. HIF genlerinin post transkripsiyonel düzenlenmesi önemli olduğundan, genlerin protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi önemli olabilir.
13. Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak SOX2 ekspresyonundaki değişim mekanizmasının anlaşılması için genin metilasyon profili incelenmelidir.
14. Tümör dokularında CD133 ekspresyonunun azalmasının arkasındaki mekanizmanın anlaşılması için p53 gen ekspresyonuna bakılmalıdır.
15. Çalışmamız sonucunda larinks kanseri patogenezinin moleküler mekanizmasında embriyonik kök hücre genlerinin ve hipoksik cevapta HIF kofaktörü olan ESRRA geninin görevi olabileceği, hipoksik ortamın bu genlerin ekspresyonunu değiştirerek kanser gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. **You JS, Jones PA.** Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell*. **2012**, 10;22(1):9-20.
2. **Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire J A, Zielenska M.** Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics*. **2008** 9(6):394-408.
3. **Eskiizmir Görkem Baş Boyun Yassı Hücreli Karsinomlarında Tümör Mikroevresi Turk Arch Otorhinolaryngol** **2015**; 53: 120-7
4. **Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M.** Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis*. **2014** Jan 23;5:e1018.
5. **Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH.** The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. **2011** Jan;11(1):9-22.
6. **Ko Can.** KBB Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi- Gneş Tıp Kitabevleri -**2013**
7. **Kaya Sefa** Larinks Hastalıkları Bilimsel Tıp Yayınevi- **2002**
8. **Zhang SY, Lu ZM, Luo XN, Chen LS, Ge PJ, Song XH, Chen SH, Wu YL.** Retrospective analysis of prognostic factors in 205 patients with laryngeal squamous cell carcinoma who underwent surgical treatment. *PLoS One*. 2013 4;8(4):e60157
9. **Akman FC, Dag N, Ataman OU, Ecevit C, Ikiz AO, Arslan I, Sarioglu S, Ada E, Kinay M; Dokuz Eylül Head and Neck Tumour Group (DEHNTG).** The impact of treatment center on the outcome of patients with laryngeal cancer treated with surgery and radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. **2008** 265(10):1245-55
10. **Vaupel P.** The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*. **2004**;9 Suppl 5:10-7.
11. **Ruan K, Song G, Ouyang G.** Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem*. **2009** 15;107(6):1053-62
12. **Chen L'Daley GQ.** Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet*. **2008** 15;17(R1):R23-7.
13. **Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD.** Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*. **2010**;139(1):85-97.
14. **<http://dx.doi.org/10.5772/57614>**
15. **Yeo JC, Ng HH.** Transcriptomic analysis of pluripotent stem cells: insights in to health an disease *Genome Med*. **2011** 27;3(10):68.
16. **Juan Rosai Rosai and Ackerman's surgical pathology volme I- 2011**
17. **Ergun K. Mine, Hayran Mrvet** Anatomi Akademisyen Kitabevi- **2014**
18. **<http://headandneckcancerguide.org/adults/introduction-to-head-and-neck-cancer/throat-cancer/laryngopharyngeal-cancer/laryngeal-cancer/anatomy/>**
19. **Yıldırım Mehmet, Dalık Hakkı** Klinik Ynleriyle İnsan Embriyolojisi - Keith L. Moore Nobel Tıp Kitabevleri-**2009**

20. **Stephen S. Sternberg** Histology for Pathologists Second Edition- LWW- **1997**.
21. **Gerçekçeker M.** Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Baş ve Boyun Cerrahisi, Akademisyen Kitabevi- **2014**.
22. **Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA, Zielenska M.** Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. *Curr Genomics*. **2008**;9(6):394-408
23. http://globocan.iarc.fr/old/summary_table_site.html.asp?selection=11100&title=Larynx&sex=0&type=0&window=1&africa=1&america=2&asia=3&europe=4&oceania=5&build=6&sort=4&submit=%C2%A0Execute;
24. TÜRKİYE KANSER KONTROL PROGRAMI, Ankara **2015**
25. <http://www.saglik.gov.tr/TR/dosya/1-97020/h/saglik-istatistik-yilligi-2013.pdf>
26. **Dorak MT, Karpuzoglu E.** Gender differences in cancer susceptibility: an inadequately addressed issue. *Front Genet*.**2012** 28;3:268.26
27. **Heroiu Cataloiu AD, Danciu CE, Popescu CR.** Multiple cancers of the head and neck. *Maedica (Buchar)*.**2013**,8(1):80-5.
28. **Chen J, Long S.** Tea and coffee consumption and risk of laryngeal cancer: a systematic review meta-analysis. *PLoS One*. **2014** 2;9(12):e112006.
29. **León X, Rinaldo A, Saffiotti U, Ferlito A.** Laryngeal cancer in non-smoking and non-drinking patients. *Acta Otolaryngol*. **2004**,124(6):664-9.
30. **Josyula S, Lin J, Xue X, Rothman N, Lan Q, Rohan TE, Hosgood HD 3rd.** Household air pollution and cancers other than lung: a meta-analysis. *Environ Health*.**2015** 15;14:24.
31. **Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Takes RP, Silver CE, Paccagnella D, Rinaldo A, Hinni ML, Ferlito A.** Relationship between reflux and laryngeal cancer. *Head Neck*. **2013** Dec;35(12):1814-8
32. **Atighechi S, Meybodan M, Dadgarnia MH, Baradaranfar MH, Behniafard N.** Investigating the Prevalence of Human Papilloma Virus in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx and Its Correlation with Disease Prognosis. *Iran J Otorhinolaryngol*. **2016**;28(86):197-202.
33. **Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, Tous S, Clavero O, Alòs L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M¹, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimerà N, Lloveras B, León X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS¹, Oh JK¹, Garcia-Rojo M¹, Iljazovic E¹, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Félix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, López-Revilla R, Mandys V, González ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, de Sanjosé S, Xavier Bosch F; ICO International HPV in Head and Neck Cancer Study Group HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*.**2016** 28;108(6):djv403.**
34. **Giraldi L, Panic N, Cadoni G, Boccia S, Leoncini E.** Association between Mediterranean diet and head and neck cancer: results of a large case-control study in Italy. *Eur J Cancer Prev*.**2016** 1. [Epub ahead of print]
35. **Lu B, Li J, Gao Q, Yu W, Yang Q, Li X.** Laryngeal cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair pathway genes ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5 and XPA. *Gene*.**2014** 25;542(1):64-8

36. **Bandeira CM, Almeida AÁ, Gonçalves AJ.** Genetic polymorphisms in the Cytochrome P450 family and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx and larynx. *Rev Col Bras Cir.*2014;41(5):366-72.
37. **Zeng W, Li Y, Lu E, Ma M** CYP1A1 rs1048943 and rs4646903 polymorphisms associated with laryngeal cancer susceptibility among Asian populations: a meta-analysis. *J Cell Mol Med.*2016;20(2):287-93
38. **Nagai MA.** Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Braz J Med Biol Res.*1999;32(7):897-904.
39. **Yu X, Li Z.** The role of microRNAs expression in laryngeal cancer. **Oncotarget.** 2015 15;6(27):23297-305.
40. <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/larynx-cancer/treatment/the-stages-of-cancer-of-the-larynx>
41. **Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilias G, Daniilidis I.** Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*2005;262(11):890-8.
42. <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/LaryngealOverviewID5087.html>).
43. <http://www.kanservakfi.com/upload/file/ajcc-kanser-evreleme-atlasi.pdf>
44. **Akman FC, Dag N, Ataman OU, Ecevit C, Ikiz AO, Arslan I, Sarioglu S, Ada E, Kinay M; Dokuz Eylül Head and Neck Tumour Group (DEHNTG).** The impact of treatment center on the outcome of patients with laryngeal cancer treated with surgery and radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*2008;265(10):1245-55
45. **Hanahan D, Weinberg RA.** The Hallmarks of Cancer Cell. **2000** 7;100(1):57-70.
46. **Ruan K, Song G, Ouyang G.** Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J Cell Biochem.* **2009** 15;107(6):1053-62.
47. **Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK.** The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl).* **2015** 11;3:83-92.
48. **Weidemann A, Johnson RS.** Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ.* **2008** ;15(4):621-7.
49. **Dayan F, Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J.** A Dialogue between the Hypoxia-Inducible Factor and the Tumor Microenvironment *Cancer Microenviron.* **2008** ; 1(1): 53–68.
50. **Hongxiang Hui, Yongming Tang, Min Hu and Xiaoning Zhao** Stem Cells:General Features and Characteristics <https://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research>
51. **Kim J, Orkin SH.** Embryonic stem cell-specific signatures in cancer: insights into genomic regulatory networks and implication for medicine. *Genome Med.* **2011** 29;3(11):75.
52. **Weina K, Utikal J.** SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med.* **2014** 4;3:19.
53. **Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan X.** The multiple roles for Sox2 in stemcell maintenance and tumorigenesis.*Cell Signal.* **2013**; 25 (5):1264-71.
54. **Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS.** MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in humanembryonic stem cells. *Cell.* **2009** 15;137(4):647

55. **Li YJ, Dong M, Kong FM, Zhou JP, Liang D, Xue HZ.** MicroRNA-371-5p targets SOX2 in gastric cancer. *Oncotarget*.**2016** 31;7(22):31993-2005.
56. **Zhou L, Zhao LC, Jiang N, Wang XL, Zhou XN, Luo XL, Ren J.** MicroRNA miR-590-5p inhibits breast cancer cell stemness and metastasis by targeting SOX2. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*.**2017**;21(1):87-94.
57. **Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, Kim SH, Beck S, Kim S, Kim H.** ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res*.**2011** 1;71(9):3410-21.
58. **Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan X.** The multiple roles for Sox2 in stemcell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal*. **2013**;25(5):1264-71.
59. **Tsuruzoe S, Ishihara K, Uchimura Y, Watanabe S, Sekita Y, Aoto T, Saitoh H, Yuasa Y, Niwa H, Kawasuji M, Baba H, Nakao M.** Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun*.**2006** 29;351(4):920-6.
60. **Baltus GA, Kowalski MP, Zhai H, Tutter AV, Quinn D, Wall D, Kadam S.** Acetylation of sox2 induces its nuclear export in embryonic stem cells. *Stem Cells*. **2009** ;27(9):2175-84.
61. **Jeong CH, Cho YY, Kim MO, Kim SH, Cho EJ, Lee SY, Jeon YJ, Lee KY, Yao K, Keum YS, Bode AM, Dong Z.** Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **2010**;28(12):2141-50.
62. **Fang L, Zhang L, Wei W, Jin X, Wang P, Tong Y, Li J, Du JX, Wong J** A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation. *Mol Cell*.**2014** 21;55(4):537-51.
63. **Weijun Su, Si Chen, Na Li** The potential role of SOX2 in the anti-apoptosis property of cancer cells *Cancer Cell & Microenvironment* **2014**; 1: e253.
64. **Hütz K, Mejías-Luque R, Farsakova K, Ogris M, Krebs S, Anton M, Vieth M, Schüller U, Schneider MR, Blum H, Wagner E, Jung A, Gerhard M.** The stem cell factor SOX2 regulates the tumorigenic potential in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. **2014** ;35(4):942-50.
65. **Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y.** SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer*. **2008** Feb 26;98(4):824-31.
66. **Wang ML, Chiou SH, Wu CW.** Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor *Onco Targets Ther*. **2013** 4;6:1207-20.
67. **Gawlik-Rzemieniewska N, Bednarek I.** The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biol Ther*. **2016**;17(1):1-10.
68. **Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG.** Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions *Stem Cells*. **2015** ;33(8):2381-90.
69. **Shi G, Jin Y.** Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther*. **2010** 14;1(5):39.
70. **Villodre ES, Kipper FC, Pereira MB, Lenz G.** Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treat Rev*. **2016**;51:1-9.
71. **Wang YJ, Herlyn M.** The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2015** 1;309(11):C709-18.

72. **Rizzino A, Wuebben EL.** Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta.* **2016** ;1859(6):780-91.
73. **Campbell PA, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Rudnicki MA.** Oct4 targets regulatory nodes to modulate stem cell function. *PLoS One.***2007** 20;2(6):e553.
74. **Guo Y, Mantel C, Hromas RA, Broxmeyer HE.** Oct-4 is critical for survival/antiapoptosis of murine embryonic stem cells subjected to stress: effects associated with Stat3/survivin. *Stem Cells.* **2008**;26(1):30-4.
75. **Yuan F, Zhou W, Zou C, Zhang Z, Hu H, Dai Z, Zhang Y.** Expression of Oct4 in HCC and modulation to wnt/ β -catenin and TGF- β signal pathways. *Mol Cell Biochem.* **2010**;343(1-2):155-62.
76. **Sun L, Liu T, Zhang S, Guo K, Liu Y.** Oct4 induces EMT through LEF1/ β -catenin dependent WNT signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* **2017**;13(4):2599-2606.
77. **Li Z** CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hematol Oncol.* **2013** 1;2(1):17
78. **Ranhotra HS.** The estrogen -related receptor α : the oldest, yet an energetic orphan with robust biological functions. *J Recept Signal Transduct Res.* **2010** ;30(4):193-205
79. **Tiwari A, Swamy S, Gopinath KS, Kumar A.** Genomic amplification upregulates estrogen-related receptor α and its depletion inhibits oral squamous cell carcinoma tumors in vivo. *Sci Rep.* **2015** Dec 7;5:17621.
80. **Ao A, Wang H, Kamarajugadda S, Lu J.** Involvement of estrogen-related receptors in transcriptional response to hypoxia and growth of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.***2008** 3;105(22):7821-6.
81. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/x4753?lang=en®ion=TR>
82. **Borel F, Han R, Visser A, Petry H, van Deventer SJ, Jansen PL, Konstantinova P** Adenosine triphosphate-binding cassette transporter genes up-regulation in untreated hepatocellular carcinoma is mediated by cellular microRNAs. *Hepatology.***2012** ;55(3):821-32. doi: 10.1002/hep.24682.
83. **Wu D, Yotnda P** Induction and testing of hypoxia in cell culture. *J Vis Exp.***2011** 12;(54). pii: 2899.
84. **Cesário JM, Brito RB, Malta CS, Silva CS, Matos YS, Kunz TC, Urbano JJ, OliveiraV, DalboniMA, DellêH.**A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-(VEGF) expression in T24 human bladder cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.***2017** ;53(3):272-276.
85. <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2015/4068/>
86. [https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/22194/2/02whole .pdf](https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/22194/2/02whole.pdf)
87. <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/.../81753>
88. **Smith H, Bard M, Pellagatti A, Turley H, Boultonwood J, Callaghan R.** The Effects of Severe Hypoxia on Glycolytic Flux and Enzyme Activity in a Model of Solid Tumors. *J Cell Biochem.* **2016** Aug;117(8):1890-901.
89. **O'Connor DJ, Lu X.** Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb. *Oncogene.* **2000** May 11;19(20):2369-76.
90. **Özyiğit Musa Özgür , Kahraman Müjdat Müfit, Akkoç Ahmet** The effects of hypoxia on the expression of vascular endothelial growth factor in broiler lung fibroblasts *Turk J Vet Anim Sci* **2015** 39: 174-180

91. **Cesário JM, Brito RB, Malta CS, Silva CS, Matos YS, Kunz TC, Urbano JJ, Oliveira LV, Dalboni MA, Dellê H** A simple method to induce hypoxia-induced vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) expression in T24 human bladder cancer cells. . *In Vitro Cell Dev Biol Anim.***2017**;53(3):272-276
92. **Hamdan FH, Zihlif MA.** Gene expression alterations in chronic hypoxic MCF7 breast cancer cell line. *Genomics.***2014** ;104(6 Pt B):477-81.
93. **Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Görlach A.** Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* **2007**;18(12):4691-7.
94. **Zúñiga J, Checa M, Maldonado-Martínez HA, Trinidad-López A, Cisneros J, Torres-Espíndola LM, Hernández-Jiménez C, Sommer B, Cabello-Gutiérrez C, Gutiérrez-González LH.** Effects of 2-methoxyestradiol on apoptosis and HIF-1 α and HIF-2 α expression in lung cancer cells under normoxia and hypoxia. *Oncol Rep.***2016**;35(1):577-83.
95. **Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN.** Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.* **2009** 2;15(6):501-13.
96. **Hamidian A, von Stedingk K, Munksgaard Thorén M, Mohlin S, Pålman S.** Differential regulation of HIF-1 α and HIF-2 α in neuroblastoma: Estrogen-related receptor alpha (ERR α) regulates HIF2A transcription and correlates to poor outcome. *Biochem Biophys Res Commun.***2015** 5;461(3):560-7.
97. **Wang M, Chen MY, Guo XJ, Jiang JX.** Expression and significance of HIF-1 α and HIF-2 α in pancreatic cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* **2015** ;35(6):874-9.
98. **Yohena T, Yoshino I, Takenaka T, Kameyama T, Ohba T, Kuniyoshi Y, Maehara Y.** Upregulation of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* **2009** ;4(3):284-90.
99. **Yoshikawa T, Tsuburaya A, Miyagi Y, Sekiguchi H, Kimura M, Cho H, Kobayashi O.** Up-regulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF mRNAs in peritoneal dissemination of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* **2006**;26(5B):3849-53.
100. **Wu Y, Jin M, Xu H, Shimin Z, He S, Wang L, Zhang Y.** Clinicopathologic significance of HIF-1 α , CXCR4, and VEGF expression in colon cancer. *Clin Dev Immunol.* **2010**;2010. pii: 537531.
- 101 **Lundberg IV, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Palmqvist R, Wikberg ML.** SOX2 expression is associated with a cancer stem cell state and down-regulation of CDX2 in colorectal cancer. *BMC Cancer.***2016** 13;16:471.
102. **Lundberg IV, Löfgren Burström A, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Stenling R, Palmqvist R, Wikberg ML.** SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS One.***2014** 10;9(7):e101957
103. **Chou YT, Lee CC, Hsiao SH, Lin SE, Lin SC, Chung CH, Chung CH, Kao YR, Wang YH, Chen CT, Wei YH, Wu CW.** The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer. *Stem Cells.***2013** ;31(12):2607-19.
104. **Ying J, Shi C, Li CS, Hu LP, Zhang WD.** Expression and significance of SOX2 in non-small cell lung carcinoma. *Oncol Lett.* **2016** ;12(5):3195-3198.

105. **Du XM, Wang LH, Chen XW, Li YX, Li YC, Cao YW.** Prognostic value of Sox2 expression in digestive tract cancers: A meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* **2016** ;36(3):305-12.
106. **Yamawaki K, Ishiguro T, Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M, Fujii M, Okamoto K, Enomoto T.** Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. *Cancer Sci.* **2017** ;108(4):632-640.
107. **Finicelli M, Benedetti G, Squillaro T, Pistilli B, Marcellusi A, Mariani P, Santinelli A, Latini L, Galderisi U, Giordano A.** Expression of stemness genes in primary breast cancer tissues: the role of SOX2 as a prognostic marker for detection of early recurrence. *Oncotarget.* **2014** 30;5(20):9678-88.
108. **Shima H, Kutomi G, Satomi F, Maeda H, Hirohashi Y, Hasegawa T, Mori M, Torigoe T, Takemasa I.** SOX2 and ALDH1 as Predictors of Operable Breast Cancer. *Anticancer Res.***2016**;36(6):2945-53.
109. **Ye F, Li Y, Hu Y, Zhou C, Hu Y, Chen H.** Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.***2011** ;137(1):131-7.
110. **Pham DL, Scheble V, Bareiss P, Fischer A, Beschorner C, Adam A, Bachmann C, Neubauer H, Boesmueller H, Kanz L, Wallwiener D, Fend F, Lengerke C, Perner S, Fehm T, Staebler A.** SOX2 expression and prognostic significance in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* **2013**;32(4):358-67.
111. **Yang Z, Pan X, Gao A, Zhu W.** Expression of Sox2 in cervical squamous cell carcinoma. *J BUON.* **2014** ;19(1):203-6.
112. **Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D.** SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics.***2011**;8(3):139-47.
113. **Chou MY, Hu FW, Yu CH, Yu CC.** Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral Oncol.* **2015** ;51(1):31-9.
114. **Sun C, Sun L, Li Y, Kang X, Zhang S, Liu Y.** Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. *Med Oncol.* **2013**;30(2):503.
115. **Herreros-Villanueva M, Zhang JS, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajaa AA, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD.** SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis.***2013** 5;2:e61.
116. **Tu L, Sun L, Zhou Y, Gong Y, Xue J, Gao J, Lu Y, Wang Y.** Postoperative radiotherapy for residual tumor of primary mediastinal carcinoid teratoma. *J Thorac Dis.* **2013**;5(2):E61-4.
117. **Tong B, Zeng J, Wu Y, Xiong W.** Enhanced SOX2 expression in retinoblastoma tissues and peripheral blood is associated with the clinicopathological characteristics of the disease. *Oncol Lett.* **2015** ;9(3):1244-1248.
118. **Otsubo T, Akiyama Y, Yanagihara K, Yuasa Y.** SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis. *Br J Cancer.***2008** 26;98(4):824-31.
119. **Chen Y, Huang Y, Zhu L, Chen M, Huang Y, Zhang J, He S, Li A, Chen R, Zhou J.** SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* **2016** Jun;142(6):1221-30.

120. **Matsuoka J, Yashiro M, Sakurai K, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K.** Role of the stemness factors sox2, oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. . J Surg Res. **2012** May 1;174(1):130-5
121. **Yang L, Xu JF, Kang Q, Li AQ, Jin P, Wang X, He YQ, Li N, Cheng T, Sheng JQ.** Predictive Value of Stemness Factor Sox2 in Gastric Cancer Is Associated with Tumor Location and Stage. PLoS One. **2017** Jan 3;12(1):e0169124
122. **Kim BW, Cho H, Choi CH, Ylaya K, Chung JY, Kim JH, Hewitt SM.** Clinical significance of OCT4 and SOX2 protein expression in cervical cancer. BMC Cancer.**2015** 26;15:1015
123. **Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS.** OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. Cell Death Dis. **2013** 8;4:e760.
124. **Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, Gao J, Zhao Z Liu C.** Oct-4 and Nanogpromote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stemcells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients.Oncotarget. **2014** 5;5(21):10803-15.
125. **Chiou SH, Wang ML Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW.** Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymaltransdifferentiation. Cancer Res. **2010** 15;70(24):10433-44.
126. **Chen Z, Wang T, Cai L, Su C, Zhong B, Lei Y, Xiang AP.** Clinicopathological significance of non-small cell lung cancer with high prevalence of Oct-4 tumor cells. J Exp Clin Cancer Res.**2012** 2;31:10.
127. **Rodriguez E, Chen L, Ao MH, Geddes S, Gabrielson E, Askin F, Zhang H, Li QK.** Expression of transcript factors SALL4 and OCT4 in a subset of non small cell lungcarcinomas (NSCLC). Transl Respir Med.**2014** 2;2(1):10.
128. **Jiang WL, Zhang PF, Li GF, Dong JH, Wang XS, Wang YY.** Oct-4 is associated with gastric cancer progression and prognosis. Onco Targets Ther. **2016** 27;9:517-22.
129. **Luo W, Li S, Peng B, Ye Y, Deng X, Yao K.** Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. PLoS One.**2013**;8(2):e56324.
130. **Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT, Tsai MH, Hou YY, Lee JH, Liou HH, Huang SF, Chen HC, Yen LM, Tseng HH, Ger LP.** Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. J Oral Pathol Med.**2016**;45(2):89-95.
131. **Pouriya Motahari, Ozra Mohiti, Mahnaz Sahebjami, Kambiz Kamyab, Mohamad Kharazifard, PlumX Metrics** OCT4 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma, Oral Epithelial Dysplasia and Normal Oral Mucosa DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2014.07.022>
132. **Tsai LL, Hu FW, Lee SS, Yu CH, Yu CC, Chang YC.** Oct4 mediates tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of epithelial-mesenchymal transition. PLoS One.**2014** 27;9(1):e87207.
133. **Lee M, Nam EJ, Kim SW, Kim S, Kim JH, Kim YT** Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma. Int J Gynecol Cancer. **2012** ;22(9):1489-96.
134. **Siu MK, Wong ES, Kong DS, Chan HY, Jiang L, Wong OG, Lam EW, Chan KK, Ngan HY, Le XF, Cheung AN.** Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation f E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers. Oncogene. **2013** 25;32(30):3500-9.

135. **Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, Lu J, Fan X, Zhu S, Wang Y, Guo Q, Wang L, Huang Y, Zhu M, Wang Z.** Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* **2013** 28;340(1):113-23.
136. **Niu CS, Li DX, Liu YH, Fu XM, Tang SF, Li J.** Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol Rep.* **2011**;26(3):593-601.
137. **Xu F, Dai C, Zhang R, Zhao Y, Peng S, Jia C.** Nanog: a potential biomarker for liver metastasis of colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* **2012** ;57(9):2340-6.
138. **Meng HM, Zheng P, Wang XY, Liu C, Sui HM, Wu SJ, Zhou J, Ding YQ, Li J.** Over-expression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* **2010** ;9(4):295-302
139. **Du Y, Ma C, Wang Z, Liu Z, Liu H, Wang T.** Nanog, a novel prognostic marker for lung cancer. *Surg Oncol.* **2013** ;22(4):224-9.
140. **Yin X, Li YW, Zhang BH, Ren ZG, Qiu SJ, Yi Y, Fan J.** Coexpression of stemness factors Oct4 and Nanog predict liver resection. *Ann Surg Oncol.* **2012** ;19(9):2877-87.
141. **Nagata T, Shimada Y, Sekine S, Hori R, Matsui K, Okumura T, Sawada S, Fukuoka J, Tsukada K.** Prognostic significance of NANOG and KLF4 for breast cancer. *Breast Cancer.* **2014**;21(1):96-101137.
142. **Chen YL, Lin PY, Ming YZ, Huang WC, Chen RF, Chen PM Chu PY.** The effects of the location of cancer stem cell marker CD133 on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *BMC Cancer.* **2017** 7;17(1):474.
143. **Huang M, Zhu H, Feng J, Ni S, Huang J.** High CD133 expression in the nucleus and cytoplasm predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Dis Markers.* **2015**;2015:986095.
144. **Sun W, Dou J, Zhang L, Qiao L, Shen N, Gao W.** Expression of CD133, E-cadherin and WWOX in colorectal cancer and related analysis. *Pak J Med Sci.* **2017**;33(2):425-429.
145. **Park EK, Lee JC, Park JW, Bang SY, Yi SA, Kim BK, Park JH, Kwon SH, You JS, Nam SW, Cho EJ, Han JW.** Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis.* **2015** 5;6:e1964.
146. **Barbatis C, Loukas L, Grigoriou M, Nikolaou I, Tsikou-Papafragou A, Marsan N, Gatter KC, Kaklamanis L.** p53 Overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Clin Mol Pathol.* **1995** ;48(4):M194-7.
147. **Mondal D, Saha K, Datta C, Chatterjee U, Sengupta A.** Ki67, p27 and p53 Expression in Squamous Epithelial Lesions of Larynx. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* **2013** Apr;65(2):126-33. Nov 8.
148. **Tiwari A, Swamy S, Gopinath KS, Kumar A.** Genomic amplification upregulates estrogen-related receptor alpha and its depletion inhibits oral squamous cell carcinoma tumors in vivo. *Sci Rep.* **2015** .7;5:17621
149. **Mirebeau-Prunier D, Le Pennec S, Jacques C, Fontaine JF, Gueguen N, Boutet-Bouzamondo N, Donnart A, Malthiery Y, Savagner F** Estrogen-related receptor alpha modulates lactate dehydrogenase activity in thyroid tumors. *PLoS One.* **2013**;8(3):e58683
150. **Tiwari A, Shivananda S, Gopinath KS, Kumar A.** MicroRNA-125a reduces proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells by targeting estrogen-related receptor α : implications for cancer therapeutics. *J Biol Chem.* **2014** 14;289(46):32276-90.

151. Lu ZM, Lin YF, Jiang L, Chen LS, Luo XN, Song XH, Chen SH, Zhang SY Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analyses in laryngeal carcinoma. *Onco Targets Ther.* **2014** 5;7:525-33.
152. ZHANG Si-yi, LU Zhong-ming, SONG Xin-han, ZHANG Hong-bin, CHEN Liang-si, LUO Xiao-ning, CHEN Shao-hua, WU Yi-long Differential microRNA expression profile in laryngeal cancer and effect of miR-125a-5p on proliferation of laryngeal cancer cell line Chin J Pathophysiol **2013**, 29 (1) 86-92
153. Li Z, Bao S, Wu Q, Wang H, Eyler C, Sathornsumetee S, Shi Q, Cao Y, Lathia J, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell.***2009** 2;15(6):501-13.
154. Salnikov AV, Liu L, Platen M, Gladkich J, Salnikova O, Ryschich E, Mattern J, Moldenhauer G, Werner J, Schemmer P, Büchler MW, Herr I. Hypoxia induces EMT in low and highly aggressive pancreatic tumor cells but only cells with cancer stem cell characteristics acquire pronounced migratory potential. *PLoS One.* **2012**;7(9):e46391.
155. Iida H, Suzuki M, Goitsuka R, Ueno H. Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *Int J Oncol.* **2012** ;40(1):71-9
156. Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H. Hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors. *PLoS One.***2013** 20;8(6):e66255.
157. Yin X, Li YW, Jin JJ, Zhou Y, Ren ZG, Qiu SJ, Zhang BH. The clinical and prognostic implications of pluripotent stem cell gene expression in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* **2013** ;5(4):1155-1162.
158. Yin X, Li YW, Zhang BH, Ren ZG, Qiu SJ, Yi Y, Fan J. Coexpression of stemness factors Oct4 and Nanog predict liver resection. *Ann Surg Oncol.* **2012** ;19(9):2877-87.
159. Bae KM, Dai Y, Vieweg J, Siemann DW. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res.* **2016** 1;6(5):1078-88.
160. Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W, Eberhart CG Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol.* **2010**;177(3):1491-502
161. Liang D, Ma Y, Liu J, Trope CG, Holm R, Nesland JM, Suo Z. The hypoxic microenvironment upgrades stem-like properties of ovarian cancer cells. *BMC Cancer.***2012** 29;12:201.
162. Mathieu J, Zhang Z, Nelson A, Lamba DA, Reh TA, Ware C, Ruohola-Baker H. Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem Cells.***2013** ;31(9):1737-48.
163. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res.* **2011** 1;71(13):4640-52.
164. Wu YM, Chen ZJ, Jiang GM, Zhang KS, Liu Q, Liang SW, Zhou Y, Huang HB, Du J, Wang HS. Inverse agonist of estrogen-related receptor α suppresses the growth of triple negative breast cancer cells through ROS generation and interaction with multiple cell signaling pathways. *Oncotarget.***2016** 15;7(11):12568-81
165. Huang JW, Guan BZ, Yin LH, Liu FN, Hu B, Zheng QY, Li FL, Zhong YX, Chen Y. Effects of estrogen-related receptor alpha (ERR α) on proliferation and metastasis of human lung cancer A549 cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.***2014** ;34(6):875-81.

- 166. Zou C, Yu S, Xu Z, Wu D, Ng CF, Yao X, Yew DT, Vanacker JM, Chan FL.** ERR α augments HIF-1 signalling by directly interacting with HIF-1 α in normoxic and hypoxic prostate cancer cells. *J Pathol.***2014**;233(1):61-73.
- 167. Casaburi I, Avena P, De Luca A, Chimento A, Sirianni R, Malivindi , Rago V, Fiorillo M, Domanico F, Campana C, Cappello AR, Sotgia F, Lisanti MP, Pezzi V** Estrogen related receptor α (ERR α) a promising target for the therapy of adrenocortical carcinoma (ACC). *Oncotarget.***2015** 22;6(28):25135-48.



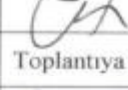
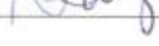
EKLER

EK 1. Etik Kurul Kararı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı		Tarih
38		9 Ocak 2015

KARAR NO 5- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nın, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nın bilimsel işbirliğiyle, Prof. Dr. Davut Alptekin yönetiminde Yrd. Doç. Dr. Özgür Sürmelioğlu'nun, Prof. Dr. Aysun Hatice Uğuz'un katkılarıyla, N. Seda Ilgaz tarafından yürütülmesi öngörülen, "Larinks Kanserli Hastalarda HIF1A, SOX2 ve NANOG Genlerinin Ekspresyon Profiline Araştırılması" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi. Projede tez yöneticisi olarak yer alan etik kurul üyesi Prof. Dr. Davut Alptekin oylamaya katılmadı.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	<i>Oylamaya katılmadı</i>
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Mehmet Kanadaş Kardiyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyostatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nermin Seda ILGAZ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara 11.05.1984
Medeni Hali : Bekar
İletişim adresi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı Başkanlığı 01230 Balcalı/ADANA

Eğitimi

1990-1995 : Ahmet Vefik Paşa İlkokulu
1995-1999 : M.E.V. Özel Köksal Toptan Lisesi (Ortaokul)
1999-2002 : Ankara Gazi Anadolu Lisesi
2003-2007 : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)
2007-2010 : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı (Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans)
2010- : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı (Tıbbi Biyoloji Doktora)
2011- : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı (Tıbbi Biyoloji Doktora) Araştırma Görevlisi

Yabancı dili : İngilizce (İyi derece) (ÜDS:85)
İngilizce (İyi derece) (YökDil:88.75)
Almanca (Başlangıç)