

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SKUAMÖZ HÜCRELİ LARENKS KANSER
ÖRNEKLERİNDEN KANSER KÖK HÜCRESİ
ELDE EDİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

İLKNUR SUER

**DANIŞMAN
PROF. DR. MUSTAFA ÖZEN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2014

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında İlknur SUER tarafından hazırlanan "Skvamöz Hücreli Larenks Kanseri Örneklerinden Kanseri Kök Hücresi Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

24 / 06 / 2014

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof. Dr. Mustafa ÖZEN (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D.)	
2.Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK (İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D.)	
3.Doç. Dr. Ömer Faruk BAYRAK (Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D.)	
4.Yrd. Doç. Dr. Gülgün GÜVEN (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik A.D.)	
5.Yrd. Doç. Dr. Mehmet YILMAZ (İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, K.B.B A.D.)	

BEYAN

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

İLKNUR SUER

İTHAF

Bu tez projesini;

Elimi her zaman sımsıkı tutan ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Metin'e,

Hayat neşem biricik kızım Elif'e,

Erdemiyle anlayışıyla ufkumu genişleten ve bana her konuda güvenen canım Babam' a,

Sevgisini ve desteğini daima yanımda hissettiğim canım Annem' e,

Varlıklarıyla beni mutlu kılan canım kardeşlerim Ayşe ve Büşra' ya,

ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca akademik çalışmalarında desteğini esirgemeyip bilgi birikimiyle her zaman yanımda olan, her türlü bilimsel soruna karşı bana güven ve cesaret veren, engin bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım çok değerli tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Mustafa ÖZEN' e,

İşine olan sevgisini ve çalışma disiplini her zaman örnek alacağım Sn. Yrd. Doç. Dr. Gülgün S. GÜVEN' e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca güler yüzlerini benden esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Mehmet SEVEN' e, Sn. Doç. Dr. Hakan ULUCAN' a ve Sn. Uz. Dr. Elif YOSUNKAYA' ya,

Tez projemde yer alan hastalara ait dokulara ulaşmamda yardımlarını esirgemeyen Sn. Yrd. Doç. Dr. Mehmet YILMAZ' a,

Tüm bilimsel zorlukları kolay hale getirmeyi başarabilen, çalışma azmi ve isteği ile bana ilham veren ve her zaman yanımda olacağını bildiğim sevgili kardeşim Ömer Faruk KARATAŞ' a,

Bilgi ve birikimini hiçbir zaman paylaşmaktan çekinmeyen değerli meslektaşlarım Serhat SEVLİ, Esra AYDEMİR, Esra GÜZEL, Murat POLAT, Seda SALMAN, Murat KAYA, Derya AKYÜZ, Betül YÜCETÜRK, Abdullah ÇELEBİ, Ali GÖKGÖZ, Dilek BAYRAKTAR ve Nazlı BİLGE' ye,

Tıbbi Genetik Polikliniği asistanlarımız olan Dr. Buğrahan DÜZ, Dr. Asuman KOPARIR, Dr. Erkan KOPARIR, Dr. Bahtiyar MAMMADOV, Dr. Emre KIRAT ve Dr. Emre KIRTAŞ' a,

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanları olan Azize TURAN, Fatma ÖNER, Salih İSENÇ, Lutfiye ALTIN ve Şenay SAYIN' a,

Ve desteklerini daima yanımda hissettiğim sevgili aileme,

Çok Teşekkür Ederim...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19710

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Larenks Anatomisi	3
2.2. Larenks Embriyolojisi.....	5
2.3. Larenks Histolojisi	5
2.4. Larenks Fizyolojisi.....	6
2.4.1. Alt Solunum Yollarının Korunması Fonksiyonu	6
2.4.2. Solunum Fonksiyonu	7
2.4.3. Konuşma Fonksiyonu	7
2.5. Larenks Kanseri.....	7
2.5.1. İnsidans ve Epidemiyolojisi	7
2.5.2. Etiyoloji.....	10
2.5.3. Patoloji	11
2.5.4. Tanı	14
2.5.5. Larenks Kanseri Metastaz	14
2.5.6. Evreleme	15
2.5.7. Larenks Kanseri Tedavide Genel Prensipler.....	18
2.6. Kök Hücreler.....	21
2.6.1. Kök Hücrelerin Tarihçesi.....	21
2.6.2. Kök Hücrelerin Biyolojisi	21

2.6.2.1. Totipotent Kök Hücreler	22
2.6.2.2. Pluripotent Kök Hücreler	23
2.6.2.3. Multipotent Kök Hücreler	24
2.6.3. Kök Hücre Çeşitleri	28
2.6.3.1. Embriyonik Kök Hücreler	28
2.6.3.2. Fetal Kök Hücreler	28
2.6.3.3. Erişkin Kök Hücreler	28
2.6.3.4. Kanser Kök Hücreler	29
2.6.4. Kanser Kök Hücrelerinde Tedaviye Direnç	32
2.6.5. Kanser Kök Hücreleri izole Etmede Kullanılan Günümüz Metodları ve Yüzey İşaretçileri	33
2.6.5.1. Hoechst 33342 Boyası Kullanılarak Yan Popülasyon Fenotipinin Tespiti	33
2.6.5.2. Küre (Sphere) Oluşturarak Kanser Kök Hücrelerin Zenginleştirilmesi	33
2.6.5.3. Aldehit dehidrogenaz (ALDH) Aktivite Analizinin Yapılması	34
2.6.5.4. Kanser Kök Hücrelerin Yüzey İşaretçileri Kullanılarak Ayırıştırılması	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Gereç	37
3.1.1. Örneklerin Eldesi	37
3.1.2. Hep-2 Hücrelerin Temini	37
3.1.3. Gereç ve Cihazlar	39
3.1.3.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	39
3.1.3.2. Solüsyonlar	40
3.1.3.3. Bilgisayar Programları	42
3.2. Yöntem	42
3.2.1. Hep-2 Hücre Kültürü ve Primer Hücre Kültürü Yapılması	42
3.2.2. İmmüno manyetik Yöntem ile Hep-2 Hücre Hattından ve Taze Larenks Tümör Dokularından Kanser Kök Hücrelerinin Eldesi	42
3.2.3. Akım Sitometrisi Yöntemi ile Kanser Kök Hücre Ayırımının Doğrulanması	46
3.2.4. Hep-2 Hücrelerinden ve Primer Kültür Hücrelerinden Küre Oluşturma Deneyi (Sphere Formation Assay) Yapılması	46
3.2.5. Primer Kültürü Yapılan Hücrelerden TRIzol RNA İzolasyonu	47
3.2.6. CD133+ ve CD133- Hücrelerden RNA İzolasyonu	47
3.2.7. RNA Derişimlerinin Ölçülmesi	48

3.2.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	48
3.2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ile Kök Hücre İşaretçilerinin İfade Düzeylerinin Araştırılması.....	50
3.2.10. İstatistiksel Analiz.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Hasta Bilgileri	53
4.2. Larenks Tümör ve Normal Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin CD34 Yüzey İşaretçisi Açısından Değerlendirilmesi	58
4.3. Hep-2 Hücrelerinde CD133 ya da CD44 Yüzey İşaretçileri ile Ayırıştırılan Hücrelerin Kök Hücre Potansiyellerinin Küre Oluşturma Deneyi İle Karşılaştırılması	60
4.4. İmmünomanyetik Yöntem ile Taze Larenks Tümör Dokularından Kanser Kök Hücrelerinin Eldesi	62
4.5. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayırıştırılan Hücrelerin Akım Sitometri Yöntemi ile Kanser Kök Hücre Ayrımının Doğrulanması	62
4.6. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayırıştırılan Hücrelerin CD133+ Olduklarının qRT-PZR ile Gen İfade Analizleri Yapılarak Doğrulanması.....	64
4.7. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayırıştırılan CD133+ Hücrelerin Kök Hücre Karakterizasyonlarının qRT-PZR ile Değerlendirilmesi	67
4.8. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayırıştırılan CD133+ Hücrelerin Kültür Edilmesi Çalışmaları.....	81
4.9. Taze Larenks Tümör Dokularından Oluşturulan Primer Kültür Hücrelerinden Küre Oluşturulması ve Bu Kürelerin Kök Hücre Karakterizasyonlarının qRT-PZR ile Değerlendirilmesi.....	81
4.9.1. Primer Kültürlerin Oluşturulması	81
4.9.2. Küre Oluşturma Deneyi ve Oluşan Kürelerde qRT-PZR ile Kök Hücre Karakterizasyonu	82
5. TARTIŞMA	85
KAYNAKLAR	90
ETİK KURUL KARARI	101
ÖZGEÇMİŞ	102

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı.....	9
Tablo 2-2: Larenks kanserlerinin bazı ülkelerdeki yerleşim sıklığı	12
Tablo 2-3: TNM evreleme sistemi.....	16
Tablo 2-3 devamı: TNM evreleme sistemi	17
Tablo 2-4: Kanser kök hücrelerin normal kök hücreler ile benzer özellikleri.....	29
Tablo 3-1: Projede kullanılan gereçler ve kullanım amaçları.....	39
Tablo 3-2: Tavsiye Edilen Besi Yeri İçeriği	43
Tablo 3-3: Reaktifler ve cDNA sentezi için gerekli miktarlar.....	49
Tablo 3-4: qRT-PZR reaktifleri	51
Tablo 3-5: qRT-PZR sıcaklık koşulları	51
Tablo 3-6: qRT-PZR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri	52
Tablo 4-1: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı’ndan temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler.....	54
Tablo 4-1 devamı: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı’ndan temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler.....	55
Tablo 4-2: 30 skuamöz hücreli larenks kanserli hastanın klinik ve patolojik özellikleri	56
Tablo 4-3: CD133+ ve – hücrelere ait RNA konsantrasyon ve saflıkları.....	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Larenksin anatomik görünümü	4
Şekil 2-2: Larenksin üst bölümünün çok katlı yassı epitel ile kaplı görüntüsü (x40, Hematoksilen Eosin).....	6
Şekil 2-3: Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kanser ölümleri oranları	7
Şekil 2-4: Larenks kanserlerinin bölgesel dağılımı	12
Şekil 2-5: Total larenjektomi sonrası özofagiyal valf yardımıyla konuşma sağlanması	20
Şekil 2-6: Blastosist içinde bulunan kök hücreler	23
Şekil 2-7: Totipotent ve pluripotent hücreler.....	24
Şekil 2-8: Multipotent özellikteki kök hücrelerin oluşturduğu embriyonik tabakalar ve bunlardan köken alan yapılar	25
Şekil 2-9: Farklı derecelerde farklılaşma potansiyeline sahip kök hücreler (Kök hücre plastisitesi)	25
Şekil 2-10: Simetrik ve asimetrik bölünme	27
Şekil 2-11: Kök hücreleri etkileyen sinyal yolları	27
Şekil 2-12: Kanser kök hücrelerin kökeni ile ilgili ortaya atılan görüşler.....	30
Şekil 3-1: Hep-2 hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü (×4ve ×10)..	38
Şekil 3-2: Taze larenks tümör dokularından elde edilen tek hücre solüsyonu	45
Şekil 3-3: cDNA sentezi	50
Şekil 4-1: Manyetik hücre ayrıştırması sonrasında CD34 ile boyanmamış kontrol hücreleri, CD34 ile boyanmış tümör doku hücreleri ve CD34 ile boyanmış normal doku hücrelerinde CD34 işaretçisi için yapılan akım sitometri analizi	59
Şekil 4-2: CD133+, CD133-, CD44+, CD44- ve ayrıştırma yapılmamış Hep-2 hücreleri ile yapılan küre oluşturma deneyi (×10).....	60
Şekil 4-3: CD133+ Hep-2, CD133- Hep-2, CD44+ Hep-2, CD44- Hep-2 ve ayrıştırma yapılmamış Hep-2 hücreleri (kontrol) ile yapılan küre oluşturma potansiyellerinin karşılaştırılması.....	61
Şekil 4-4: Manyetik hücre ayrıştırması sonrasında CD133 ile boyanmamış kontrol hücreleri, CD133 işaretleme yapılan CD133- ve CD133+ hücrelerde CD133 işaretçisi için yapılan akım sitometri analizi.....	63
Şekil 4-5: CD133+ ve CD133- hücrelerde CD133 ifade düzeyi	65
Şekil 4-6: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CD133 ifade düzeyi	66

Şekil 4-7: CD133+ ve CD133- hücrelerde SOX2 ifade düzeyi.....	68
Şekil 4-8: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama SOX2 ifade düzeyi.....	69
Şekil 4-9: SOX2 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi .	69
Şekil 4-10: CD133+ ve CD133- hücrelerde OCT4 ifade düzeyi.....	70
Şekil 4-11: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama OCT4 ifade düzeyi.....	71
Şekil 4-12: OCT4 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi	71
Şekil 4-13: CD133+ ve CD133- hücrelerde KLF4 ifade düzeyi	72
Şekil 4-14: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama KLF4 ifade düzeyi	73
Şekil 4-15: KLF4 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi	73
Şekil 4-16: CD133+ ve CD133- hücrelerde ABCG2 ifade düzeyi.....	74
Şekil 4-17: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama ABCG2 ifade düzeyi.....	75
Şekil 4-18: ABCG2 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi	75
Şekil 4-19: CD133+ ve CD133- hücrelerde CXCR4 ifade düzeyi.....	76
Şekil 4-20: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CXCR4 ifade düzeyi.....	77
Şekil 4-21: CXCR4 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi	77
Şekil 4-22: CD133+ ve CD133- hücrelerde CD44 ifade düzeyi	78
Şekil 4-23: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CD44 ifade düzeyi	79
Şekil 4-24: CD44 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi	79
Şekil 4-25: Analiz edilen genlerin ifade düzeylerinin heatmap gösterimi.....	80
Şekil 4-26: Primer kültür hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş örnek görüntüleri.....	82
Şekil 4-27: Primer kültür hücrelerinin uygun kök hücre kültür koşullarında oluşturdukları küre görüntüleri (x10 ve x40).....	83
Şekil 4-28: Düşük bağlanma kapasiteli (Low attachment) platelerde normal besi yeri ve kök hücre besi yerinde kültür edilen primer kültür hücrelerinde Oct4 gen ekspresyon düzeyi karşılaştırılması	84
Şekil 4-29: Düşük bağlanma kapasiteli (Low attachment) platelerde normal besi yeri ve kök hücre besi yerinde kültür edilen primer kültür hücrelerinde Klf4 gen ekspresyon düzeyi karşılaştırılması	84

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
AJCC	American Joint Committee for Cancer Staging and End Result Reporting
ALDH1	Aldehid dehidrogenaz 1
AML	Akut miyeloid lösemi
bFGF	Recombinant Human Fibroblast Growth Factor- Basic
CD	Cluster of differentiation
CXCR4	Chemokine receptor 4
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
IGF	Insulin Growth Factor
IVF	<i>In vitro</i> fertilizasyon
kDa	Kilo dalton
KKH	Kanser kök hücre
KLF4	Kruppel-like family of transcription factor 4
L-Glu	L-Glutamin
M	Metastaz
µm	Mikrometre
miR	Mikro-RNA
N	Lenf nodu sayısı
NOD/SCID	Non-obese diabetic/severe combined immunodeficient
OCT4	Octamer-binding protein 4
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrine
PSA	Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin
SHK	Skvamöz hücreli karsinom
SOX2	Sex determining region Y-box 2
SP	Side population
T	Tümör boyutu
UICC	Union International Counter Cancer

ÖZET

Suer, I. Skuamöz hücreli larenks kanser örneklerinden kanser kök hücresi elde edilmesi ve karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, DETAE Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2014.

Larenks malignitelerinin %90-95' i skuamöz hücreli karsinom olup baş-boyun bölgesindeki bu cins tümörlerin % 25' i larenkste yerleşmiştir. Larenks kanseri 100.000' de 3–10 sıklıkla erkeklerde en sık görülen kanserlerden biridir. Tümör evrelemesi için anotomik olarak glottik, subglottik ve supraglottik şeklinde sınıflandırılırlar. Çoğu vakada tümör glottik yerleşimlidir. Larenkste skuamöz hücreli kanser gelişiminde sigara çok önemli bir faktördür. Alkol kullanımı da larenks kanseri insidansını arttırıcı etkiye sahiptir. Kanser kök hücreleri kanser kitlesi içinde bulunan nadir hücre popülasyonudur ve kök hücre gibi davranarak tümör gelişiminden ve metastazından sorumlu oldukları düşünülmektedir. Kanser kök hücreleri bugüne kadar birçok kanser türünde izole edilmiştir. Normal kök hücrelere benzer şekilde kanser kök hücreleri de birçok farklı hücreye farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Bunun yanında tümör gelişiminin idamesinde ve tümör dokusundaki heterojen yapıda etkili oldukları düşünülmektedir. Larenks kanserinde kanser kök hücrelerinin karakterizasyonu için CD133 hücre yüzey işaretçisi ile yapılan hücre ayrıştırması çalışmaları larenks kanseri hücre hattı olan Hep-2 hücreleriyle sınırlıdır.

İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda opere olan 30 skuamöz hücreli larenks kanseri vakasında rutin patolojik inceleme için alınan tümör dokuları bu çalışmaya dahil edildi. Elde edilen bu dokulardan immünomanyetik ayırma tekniği kullanılarak kanser kök hücreler ayrıştırıldı. Ayrıştırılan CD133 pozitif hücrelerinin kök hücre işaretçileri açısından değerlendirilmesi akım sitometri ve gerçek zamanlı PZR ile yapıldı. Sonuç olarak, taze larenks tümör dokusunda CD133 pozitif kanser kök hücrelerin varlığı ve karakterizasyonu literatürde ilk kez bu tez projesi aracılığıyla gösterildi. Böylece larenks kanserinde kanser kök hücreleri açısından zenginleşmiş CD133 pozitif hücreleri hedefleyen yeni terapötik araçların geliştirilmesi için yararlı bir yaklaşım sunulmuş oldu.

Anahtar Kelimeler: Skuamöz hücreli larenks kanseri, kanser kök hücresi, CD133, qRT-PZR, Akım Sitometri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **19710**

ABSTRACT

Suer, I. Cancer stem cell identification and characterization from the squamous cell larynx cancer' s samples. İstanbul University, Institute of Health Science, DETAE Department of Genetics. Master of Science Thesis. İstanbul. 2014.

In head and neck region, 25% of the tumors are localized at larynx and 90-95% of these laryngeal malignancies are squamous cell carcinoma. Larynx cancer is one of the most prevalent tumor types with a ratio of 3–10 out of 100,000. Larynx tumors are classified as glottic, subglottic and supraglottic according to their anatomical position. In most cases tumor is localized in glottic region. Smoking is an important factor that involves in the development of squamous cell carcinoma at larynx and alcohol usage increases the incidence of the laryngeal malignancies. Cancer stem cells (CSCs), comprised of a rare subpopulation of tumor masses, are thought to act as stem cells and be responsible for cancer initiation, progression and metastasis. They have been isolated from several cancer types and similar to normal stem cells, they have potential to differentiate into several cell lineages. Besides, they are thought to have effects on maintenance of tumor progression and heterogeneity of tumor tissue. CD133 has been suggested as a putative marker for CSCs in larynx cancer, however, attempts to characterize CSCs were restricted to functional studies carried out with Hep-2 cells.

30 patients with squamous cell larynx carcinoma who were operated at I.U. Cerrahpasa Medical School Department of Otolaryngology were included in this study. CSCs were separated from the freshly resected tumor samples via magnetic activated cell sorting technique. CD133 positive cells were evaluated for the expression of stem cell markers by flow cytometry and real-time PCR analysis. In conclusion, to our knowledge, the presence of CD133 positive cells with cancer stem cell properties in freshly resected larynx tumor tissue and their characterization is demonstrated for the first time in the literature in this study. Thus, our results provides a useful approach to characterize CD133 positive cells which are enriched for CSCs that will help developing novel therapeutic tools specifically targeting these cells.

Key Words: Squamous cell larynx cancer, cancer stem cell, CD133, qRT-PCR, Flow Cytometry

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. **19710**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik ve/veya epigenetik olmak üzere birçok değişkenin meydana getirdiği kanser günümüz hastalıkları arasında önemli bir hastalıktır ve larenks kanseri de bu noktada bir istisna değildir (1). Boynun ön kısmında 3-6. boyun vertebraları seviyesinde yerleşmiş solunum ile konuşma fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde rol oynayan bir organ olan larenks supraglottik, glottik ve subglottik olmak üzere 3 bölümden oluşmaktadır (2). Erişkinlerde tüm kanserlerin % 2'sini oluşturan larenks kanseri erkeklerde % 2,2 oranında gözlenirken kadınlarda ise bu oran % 0,4' tür (3).

Son yıllarda kadınlarda görülme sıklığı artmıştır ve buna etken olarak kadınların sigara kullanımı ile meslek hayatında toksik maddelere maruziyetinin artması gösterilmiştir (3, 4). Tedavi planlaması yeterince doğru yapılırsa larenks kanserlerinin baş-boyun kanserleri arasında tedaviye iyi yanıt veren kanserlerden olduğu bilinmektedir (5).

Özellikle erken evre larenks kanserlerinde radyoterapi veya parsiyel larenjektomi ile tedavi şansı daha da artmaktadır. Bu sayede hastanın hem ölüm riski minimize edilmekte hem de ses ve larenks işlevleri korunmaktadır. İleri evre larenks kanserlerinde ise genellikle total larenjektomi tercih edilmektedir (6).

Sınırsız çoğalabilme, kendini yenileyebilme ve tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği gibi özelliklere sahip olan kök hücrelerin (7) kanser dokusu içinde de bulunup kanserin başlamasından, metastazından ve kanserin günümüz tedavi tekniklerine karşı direncinden sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Tümör dokusu içinde yer alan küçük hücre popülasyonu olan bu hücrelere kanser kök hücreler denilmektedir (8).

Kanser tedavisinden sonra çoğu zaman hastalığın tekrarladığı gözlenmektedir. Bu durumdan sorumlu olan şeyin tedavi aşamasında tedaviye dirençli olan kanser kök hücrelerinin yok edilememesi olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle kanser kök hücrelerini doğru yöntemlerle hedefleyerek öldürmek önem kazanmaktadır. Kanser kök hücrelerine spesifik hücre yüzey işaretçileri ile yeni tedavi teknikleri geliştirilmesi hedeflenmelidir (9).

Çeşitli ayırıştırma teknikleri ile tümör dokusundaki diğer kanser hücrelerinden ayırıştırılabilen kanser kök hücreler bugüne dek birçok kanser türünde elde edilmiştir. Bu tez projesi kapsamında immünomanyetik ayırma tekniği kullanılarak İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz AD' dan temin edilen toplam 30 skuamöz hücreli larenks karsinom hastasından rutin patolojik inceleme için alınan tümör dokusunun bir kısmı ile çalışılarak kanser kök hücre ayırıştırması yapıp CD44+, CD133+ ve/veya CD34- fenotiplerinden hangisi ya da hangilerinin bulunduğu araştırılmıştır. Akım sitometri tekniği ile doğrulaması yapılmıştır. Bu sayede skuamöz hücreli larenks karsinomlarında mevcut olan kanser kök hücreler kantitatif gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) tekniğiyle karakterize edilerek kendilerine spesifik hücre yüzey işaretçi proteinlerinin belirlenmesi ve bu hücrelerin belirli kök hücre işaretçisi genleri eksprese edip etmediğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu veriler ışığında larenks kanser kök hücrelerini hedefleyen yeni tedavi teknikleri geliştirilmesine katkı sağlanmış olacaktır (10).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Larenks Anatomisi

Larenks boynun ön kısmında 3-6. boyun vertebraları seviyesinde yerleşmiş solunum ile konuşma fonksiyonunun gerçekleştirilmesinde rol oynayan bir organdır. Çocuklarda 1-4. boyun vertebraları seviyesinde yerleşen larenks yaşla birlikte aşağıya inerek ergenlik çağında 3-6. boyun vertebraları seviyesine yerleşmektedir (2).

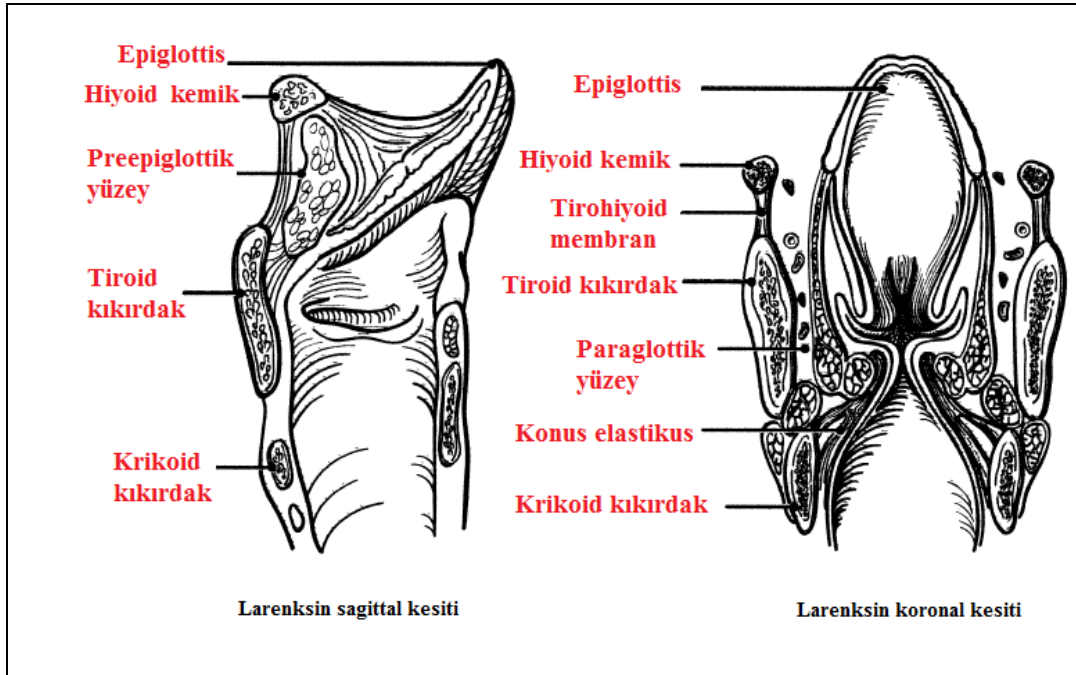
Dil kökü ile trakea arasında bulunan larenks arkada farenksin alt parçası ile temas halindedir ve burada farenksin ön duvarını yapar (11).

Hiyoid kemik ile trakea arasında yerleşmiş olan larenks hiyoid kemiğine ligamanlar ve tirohiyoid kas ile bağlıdır. Ayrıca yapısında 3 çift ve 3 tek olmak üzere toplam 9 adet kıkırdak mevcuttur. Çift olan kıkırdaklar; aritenoid, kuneiform, kornikulat; tek olanlar ise tiroid, krikoid ve epiglottistir (Şekil 2-1) (12).

Epiglottis elastik kıkırdak, diğerleri ise hyalen kıkırdak tiptedir. Hyalen tipte olan tiroid kıkırdak ile krikoid kıkırdağın kalsifikasyonu erkekte yirmili yaşlarda gözlenirken kadınlarda daha geç yaşlarda başlamaktadır. Kansere yayılımına dirençli olan hyalen kıkırdağa, tümörler ancak kalsifikasyon sonrası yayılabilmektedir (2, 11).

Larenksin üst kısmı solunum yolunu daraltabilecek ve gerektiğinde tamamen kapatabilecek özelliktedir. Larenks kasları bu sayede yabancı maddelerin solunum yollarına geçişini engellemede rol oynamaktadır. Ayrıca larenks kasları, larenks kıkırdaklarının şeklini değiştirmede rol oynayarak dolaylı yoldan ses plikalarının ses oluşturacak hale gelmesinde de etki göstermektedir (11).

Larenksin lenf damarları mukozal ve submukozal sistem olmak üzere iki sistemden oluşmaktadır. Tüm mukoza boyunca yayılan mukozal sistemin aksine submukozal sistem birbirinden bağımsız bölümlere ayrıldığından kanser metastazlarının aranmasında veya metastaza göre kanserin larenksin hangi bölgesinde olduğunu saptamada önem kazanmaktadır. Lenfatik kanalların az sayıda olduğu glottik alanda karsinomun metastazı nadirken lenfatiklerden zengin olan supraglottik alanda ise daha sıktır (13).



Şekil 2-1: Larenksin anatomik görünümü

(14)' ten değiştirilerek alınmıştır.

Larenks lenfatik dağılım yapısı ve fonksiyon açısından değerlendirildiğinde başlıca üç bölümde incelenmektedir (15).

- **Supraglottik bölge:** Epiglottis ile aritenoid kıkırdağın larengeal yüzü, ariepiglottik plikalar, yalancı vokal kordlar (ventrikuler bandlar) ve ventriküllerin yer aldığı bu bölüm epiglottisin başından gerçek vokal korda kadar uzanmaktadır. İki taraflı olarak lenfatiklerden oldukça zengin olan supraglottik bölgenin glottik bölge ile arasında, vokal kordun skuamöz epiteli ve ventrikülün respiratuar mukozası bulunmaktadır.
- **Glottik bölge:** İki vokal kord ile onları birleştiren anterior komissür ve posterior kommissürün yer aldığı bu bölüm ventrikül apeksi ile horizontal plan arasını kaplamaktadır. Lenfatiklerden oldukça fakirdir.
- **Subglottik bölge:** Gerçek kordların alt sınırı ile birinci trakea kıkırdağı arasında yer alan bu bölümün glottik bölgeyle arasındaki sınır, vokal kordun serbest kenarının 5mm altından başlamaktadır. Subglottik bölgenin alt sınırı ise krikoid kıkırdağın alt kenarındadır (3, 16).

Larenksin anatomisinin iyi bilinmesi bu bölge kanserlerinin hızlı ve doğru olarak belirlenip en etkin tedavinin seçilebilmesinde önemli rol oynamaktadır (17).

2.2. Larenks Embriyolojisi

Embriyolojik gelişimin 4. haftasında orta laringotrakeal yarık halinde farinks ventral duvarından başlayarak oluşan yarığın derinleşmesiyle laringotrakeal tüp oluşur. Bu tüp endoderm ile kaplanır. Laringotrakeal tüpün baş kısmından larenks ve trakea gelişirken, alt ucundan iki lateral çıkıntı oluşarak bronşlar ile sağ ve sol akciğer lobları gelişir (18).

Larenksin epiteli endoderm kökenliyen, kıkırdak ve kasları mezenşim kökenlidir. Bu mezenşimin proliferasyonu laringeal boşluk T şeklindeki bir açıklık haline gelir. Mezenşimin tiroid, krikoid ve aritenoid kıkırdaklara dönüşmesiyle laringeal boşluk tipik yapısını kazanmaya başlar (19).

Laringeal epitelin kıkırdakların oluşumunu takiben hızla çoğalması sonucu laringeal boşluk geçici olarak tıkanır. Bu kanalın 10. hafta civarında tekrar açılmasıyla laringeal ventrikül adı verilen bir çift lateral çukur oluşur ve bunlar ileride yalancı ve gerçek vokal kordlara geçicek olan doku katlantılarıyla çevrelenir (19). Postnatal dönemde de gelişimi devam eden larenksin, 25 yaş civarında başlayan kemikleşme süreci 65 yaş civarında tamamlanır (20).

2.3. Larenks Histolojisi

Yenidoğan larenksinde vokal kord dışındaki alanlar silli kolumnar epitelle döşeliyken, 6. aydan itibaren yalancı vokal kord stratifiye skuamöz epitelle (çok katlı yassı epitel) döşelidir (21). Epiglottisin lingual (ön) yüzünün tümü çok katlı yassı epitel ile örtülüken, laringeal (arka) tarafının üst bölümü ise çok katlı yassı epitelten silli kolumnar tip epitele doğru değişir. Bu iki tip epitel arasındaki geçiş keskin veya 1-2 mm'lik bir transizyonel zon içerecek şekilde meydana gelir. Larenksin supraglottik ve infraglottik kısmı silli kolumnar tip epitelle örtülüken glottik kısım çok katlı yassı epitelle örtülüdür (22).

Birçok hücre tabakasından oluşan çok katlı yassı epitel, dokunun oldukça kalın olmasını sağlamaktadır. Yüzeydeki hücreler yassıyken bazal lamina üzerine oturan ve hücre üretiminden sorumlu olan hücreler kübik veya prizmatik olabilmektedir (Şekil 2-2). Yeni hücreler büyürken, yaşlı hücreler yukarı itilir ve bu hücreler yassılaşımaya başlar. Çok katlı yassı epitel hücreler vücutta ağız, özefagus, epiglotisin bir kısmı, kornea ve derinin epidermisi gibi çeşitli bölgelerde bulunabilmektedir (23).

Silli kolumnar tip epitel ise silindir şeklinde hücelere sahip olup solunum yolları, mide, bağırsak ve benzeri yapıların iç boşluklarını döşeyerek koruma, kayganlaştırma, salgılama ve absorbe etme gibi fonksiyonlarda rol oynamaktadır (24).

Sigara içmeyen erişkinlerin bir kısmında supraglottik ve infraglottik bölgelerde silli kolumnar tip epitelin içinde çok katlı yassı epitel adaları vardır buna karşılık sigara içen bireylerde larenksin silli kolumnar epiteli tamamen çok katlı yassı epitel ile yer değiştirebilmektedir (3).



Şekil 2-2: Larenksin üst bölümünün çok katlı yassı epitel ile kaplı görüntüsü (x40, Hematoksilen Eosin)

(25)' ten değiştirilerek alınmıştır.

2.4. Larenks Fizyolojisi

Larenks 3 önemli fonksiyona sahiptir.

2.4.1. Alt Solunum Yollarının Korunması Fonksiyonu

Sindirim yoluna besin alınmasını takiben yutma gerçekleştiğinde solunum yolunun kapatılarak, akciğerlerin sıvı ve katı gıdaların girişinden korunması görevini larenks üstlenir.

2.4.2. Solunum Fonksiyonu

İnspirasyonun başlaması için solunum merkezi olan medulla oblongatadan gelen uyarıyla n.laryngeus inferiorun uyarılması ve bunun sonucunda da glottik açılma gereklidir. Ardından diğer mekanizmaların devreye girmesiyle diyafram aşağıya iner ve böylece solunum gerçekleşir.

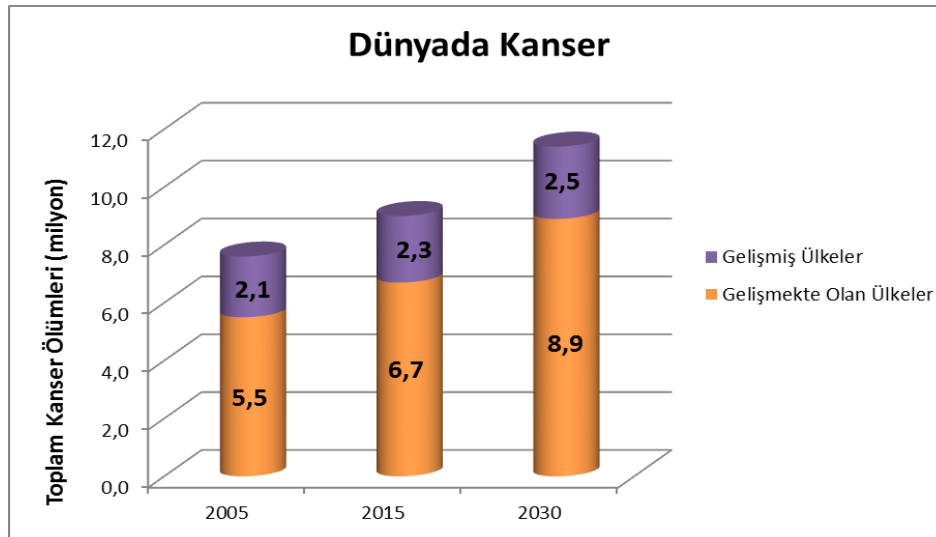
2.4.3. Konuşma Fonksiyonu

Larenksin konuşmadaki rolü en ileri fonksiyonu olarak kabul edilmektedir (15).

2.5. Larenks Kanseri

2.5.1. İnsidans ve Epidemiyolojisi

Kanser oldukça değişken genetik ve epigenetik değişikliklerle oluşan bir hastalıktır. Şekil 2-3'teki Dünyadaki kanser değerlendirmesine bakıldığında gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere kıyasla kanserin daha sık olduğu görülmektedir. Fonksiyonel çalışmalarda kanserin karmaşıklığını ve polimorfizmlerini anlamak önemlidir. İnsanlarda kanserin başlaması ve gelişmesi çeşitli mutasyonlar, kromozomlarda oluşan bozukluklar ve artan/azalan gen ekspresyonları ile karakterize edilmektedir. Kanserli genomlarda artan transkript seviyesi, onkogenlerin çoğalmasıyla beraber artan gen kopya sayısı ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile ilişkilendirilmektedir (1).



Şekil 2-3: Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kanser ölümleri oranları

(26) T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu verilerinden değiştirilerek hazırlanmıştır.

Ağız boşluğu, yutak, larenks ve burun boşluğunda oluşan çeşitli epitelyal kökenli tümörleri ifade eden baş ve boyun kanserleri her yıl yaklaşık yarım milyon yeni vaka ile dünya çapında altıncı en yaygın kanserdir. İnsidansı hala çeşitli coğrafik bölgelerde artan bu kanserler günümüzde genç bireyleri de etkilemektedir (27).

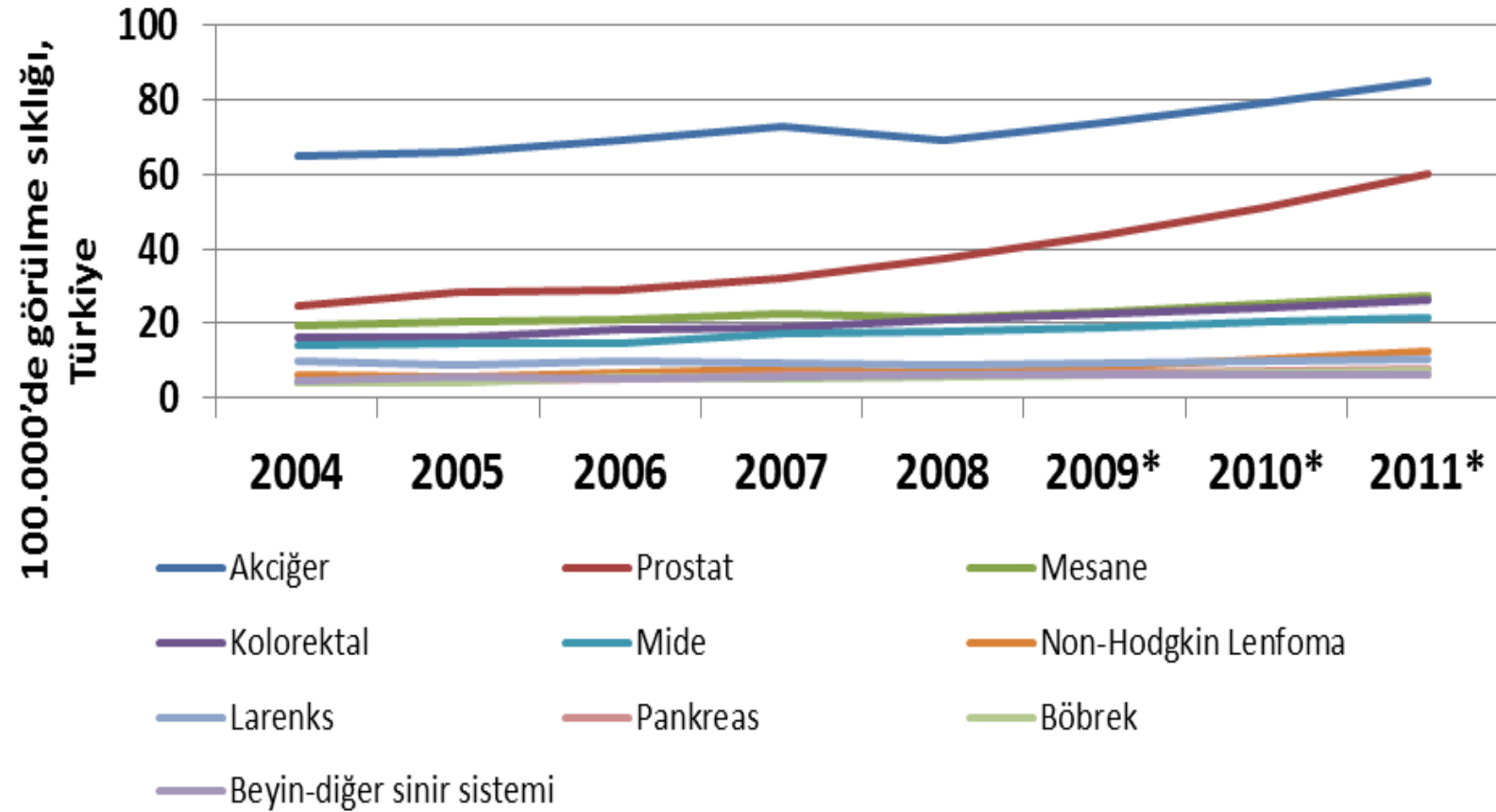
Erişkinlerde tüm kanserlerin %2' sini ve Dünya genelindeki tüm kanser ölümlerinin ise %2,1' ini oluşturan larenks kanseri baş-boyun skuamöz hücreli karsinomları arasında en sık gözlenen 2. kanserdir. Üst solunum yolu kanserleri arasında da en sık gözlenen kanser türü olan larenks kanserlerinin yaklaşık %90-95' i skuamöz (yassı) hücreli karsinom (SHK) veya epidermoid karsinom varyasyonlarından oluşmaktadır. Ayrıca baş-boyun bölgesindeki bu cins tümörlerin %25'i larenkste yerleşmiştir (1, 13, 28, 29).

Larenks kanserinin en sık görülme yaşı 5–7. dekadlar arasında yoğunlaşmakla birlikte daha genç yaşlarda görülme sıklığı %1 olarak bildirilmiştir (13, 30, 31). Larenks kanseri görülme sıklığı 3–10/100.000 aralığında insidanslar ile ülkelere göre değişmektedir (32). 2012 verilerine göre en yüksek insidans yılda 7,6/100.000 ile Küba' da saptanmış olup 5.7-6.3/100.000 insidans ile Gürcistan, Ermenistan ve Macaristan diğer sık görülen ülkelerdir. Bu ülkeleri 3,8-4,1/100.000 insidans ile Belarus, Fransa, Türkiye, İspanya takip etmektedir. Afrika ülkeleri, doğu Asya, Yeni Zelanda ve Norveç gibi ülkelerde ise 1,9/100.000' in altında olduğu bildirilmiştir (33).

Birçok ülkede 5:1 olarak bildirilen larenks kanserli erkek/kadın oranı, bazı ülkelerde 30:1 olabilmektedir (32, 34). Bu oran bazı kaynaklarda ise dünya genelinde 7:1 olarak bildirilmiştir (35). Tablo 2-1'deki Sağlık Bakanlığı kayıtları değerlendirildiğinde 2011 yılı verilerine göre Türkiye' de larenks kanseri 7. en sık görülen kanser olarak belirtilmektedir. Larenks kanserli hastalarda sıklıkla akciğer, baş-boyun ve özofagusta olmak üzere % 4-30 oranında sekonder kanserler gelişebilmektedir (36).

Tablo 2-1: Yıllara göre erkeklerde en sık görülen 10 kanser türünün insidansı

(37)' den değiştirilerek hazırlanmıştır. (* Bu yıllara ait insidans değerleri tahmini değerlerdir)



2.5.2. Etiyoloji

Larenks kanseri etyolojisinde kalıtım, boya-benzin gibi kimyasallar, odun tozu, asbest, çeşitli metal tozları, kişinin hormonal durumu ile beslenme diyeti, sülfirik asit, kömür gibi hava kirliliğine yol açabilecek diğer etmenler ve radyasyon gibi birçok etmen rol oynarken en önemli faktörün sigara olduğu bilinmektedir (22, 38-42). Yani larenksi etkileyebilecek etmenler konjenital, inflamatuvar veya travmatik anomaliler olabilmektedir (43, 44).

Larenks kanserli hastaların % 95' inde sigara kullanımının mevcut olduğu tespit edilmiştir. Larenks kanserinin agresifliğini sigara kullanım süresi ve yıllık paket sayısının etkilediği belirtilmiştir (45). Bazı araştırmacılara göre risk faktörlerinin ortadan kalkması için sigarayı bıraktıktan sonra yaklaşık 10-15 yıl kadar bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Buna karşın bazı araştırmacılar hücrede belirgin miktarda kümülatif hasar oluştuktan sonra sigarayı bırakmanın etkisinin az olduğunu belirtmiştir (46).

Sigara kullanmayan kişilerde larenks kanserinin nadiren gözlemlendiği bilinmektedir (16). Sigara ve alkol kullanmayanlarda kullanan kişilere kıyasla larenks kanserinin yaklaşık 10 yıl geç ortaya çıktığı ve bu kanserlerin sıklıkla metastaz kapasitesi az olan glottik bölgede yerleştiği saptanmıştır. Ayrıca bu kişilerin sağkalım oranları sigara-alkol tüketenlere göre daha yüksek bulunmuştur (47).

Alkol de larenks kanserinde rol oynayan bir risk faktörüdür ve sigara ile bir arada kullanıldığında sinerjist karsinojenik etkili oldukları bilinmektedir (1, 48). Yapılan bir çalışmada larenks kanseri riskinin, sigara kullanmayan alkol bağımlılarında 2,46 kat ve alkol kullanmayan sigara bağımlılarında 9,38 kat arttığı gözlenmiştir (49). Hem alkol hem de sigara tüketenlerde ise bu riskin 26 kat arttığı tespit edilmiştir (45).

Sigara ve alkol kullanmayan kişilerde görülen larenks kanserinde Larengofarengeal reflü, Gastroözofagiyal reflü gibi durumların etken olabileceği bildirilmektedir (1, 50).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda larenksin skuamöz hücreli karsinomlarının etyolojisinde viral faktörlerin (Epstein Barr Virüs, Human Papilloma Virüs) rol alabileceği üzerinde durulmuştur (51, 52). Bir diğer risk faktörü olarak da kesin kanıtlanmış olmamakla birlikte gen polimorfizmleri gösterilmektedir. Özellikle sigaradaki karsinojen maddelerin oluşturduğu hasar için DNA onarımı ile ilgili olan

genlerin polimorfizmi üzerinde durulmaktadır (53). Monteiro ve arkadaşlarının çalışmalarında Cyclin D1 gen amplifikasyonu ile glottik kanserler arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (54). Kişinin hormonal durumu ile beslenme diyetindeki dengesizliklerin de larenks kanseri için risk olduğu bildirilmektedir (32, 53, 55). Alkol ve sigara tüketen larenks kanserli hastaların % 25-50'sinde kanser ile beslenme diyeti arasında ilişki bulunmuştur (56). Larenks kanseri için bir diğer risk faktörü olarak iyonize radyasyon ileri sürülmektedir. (36, 45).

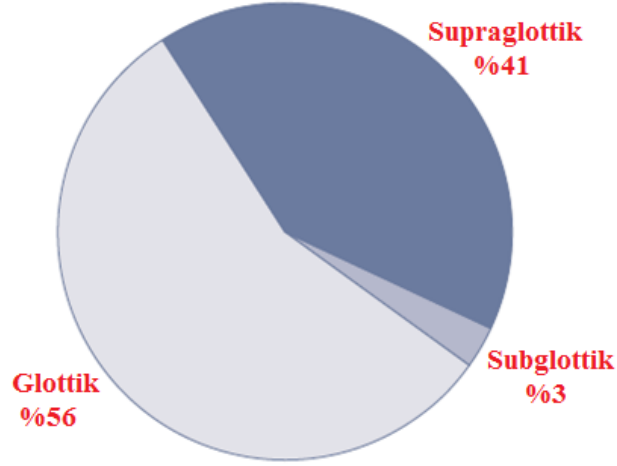
2.5.3. Patoloji

Skvamöz hücreli karsinom (SHK, yassı epitel hücreli karsinom) en fazla deride gözlenirken diğer en sık gözlendiği bölge larenkstir (57).

Histopatolojik olarak % 90-95'i SHK olan larenks kanserlerinin % 50-65'i glottik bölgede, % 30-45' i supraglottik bölgede, % 1-3' ü subglottik bölgede ve % 5'den azı transglottik bölgede yerleşmektedir (35, 58, 59) (Şekil 2-4).

- **Supraglottik kanserler:** Supraglottik bölgenin lenfatikten zengin olması nedeniyle, epiglottisin serbest ucundan ventriküle kadar olan kısma yerleşebilen bu tümörlerin lenfatik metastaz riski yüksektir (58). Kolayca tiroid kıkırdağa yerleşebildiklerinden ve preepiglottik alana yayılabildiklerinden prognozun kötü olduğu kanserlerdir (3).
- **Glottik kanserler:** Genellikle öne ve arkaya doğru yayılarak vokal kası tutabilen ve çoğu zaman iyi diferansiye (grade 1) tümör olarak ortaya çıkan bu kanserlerin, glottik bölgenin lenfatikten oldukça fakir olması nedeniyle lenfatik metastaz riski düşüktür. Prognozun daha iyi seyrettiği bu kanserlerde ön komissürlara yerleşim söz konusu olursa prognoz kötüleşmektedir (60).
- **Subglottik kanserler:** Vokal kordlardan 1 cm aşağıdan başlayarak krikoid kıkırdak alt kenarına kadar uzanabilen bu tümörler metastaz kapasitesi yüksek tümörlerdir. Sıklıkla Delphian lenf bezi metastazı yapan bu tümörlerin krikoid ve tiroid kıkırdağa yayılma oranı yüksektir. Yukarıya doğru metastaz ile glottik ve supraglottik bölgelere, aşağıya doğru metastaz ile trakeaya ve geriye doğru metastaz ile krikoid kıkırdağın altından özofagusu veya tiroide yerleşebilmektedir (61).

- **Transglottik kanserler:** Supraglottik veya subglottik bölgeden glottisi vertikal (dikey) geçerek diğer bir bölgeyi tutan tümörlerdir. Servikal lenf bezi metastazı yüksek olan bu kanserler erken dönemde paraglottik alana yayılabildiklerinden prognozları kötüdür (3, 52).



Şekil 2-4: Larenks kanserlerinin bölgesel dağılımı

(16)' dan değiştirilerek alınmıştır.

Larenks kanserlerinin bazı ülkelerdeki yerleşim sıklığı Tablo 2-2' de görülmektedir. Glottik karsinomanın supraglottik karsinomaya oranı dünyada coğrafi dağılımda farklılıklar göstermektedir (62).

Tablo 2-2: Larenks kanserlerinin bazı ülkelerdeki yerleşim sıklığı

(62)' den değiştirilerek alınmıştır.

	Japonya	Finlandiya	Yugoslavya	ABD	İsveç
Supraglottik %	49	67	62	34	11
Glottik %	50	32	35	65	87
Subglottik %	0,9	1	3,5	1	2
Hasta Sayısı	6360	638	722	1645	578

Topuz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da Akdeniz ülkelerinde %60 oranla gözlenen supraglottik larenks kanserlerinin glottik larenks kanserlerinden daha sık olduğu buna karşın diğer ülkelerde ise glottik larenks kanserlerinin daha sık olduğu belirtilmiştir (34).

Larenks karsinomları diferansiasyon derecesi ve mitotik aktivitelere göre 3 gruba ayrılmaktadır;

- iyi diferansiye (**Histolojik grade 1**),
- orta derecede diferansiye (**Histolojik grade 2**)
- az diferansiye (undiferansiye) (**Histolojik grade3**) (3, 12)

Histolojik grade' in (derecenin) prognozu ne şekilde etkilediği örneklenecek olursa; az differansiye tümörler kötü prognozla ilişkiliyken iyi ve orta derecede differansiye tümörler arasında prognoz açısından istatistiksel olarak farklılık olmadığı bildirilmektedir (63). Ayrıca histolojik grade' in radyoterapi etkinliği üzerine etkili olduğu gösterilip grade 2 tümörlere nazaran grade 1 ve grade 3 tümörlerde daha iyi bölgesel kontrol sağlandığı belirtilmiştir (64). Bunun yanı sıra grade 1 kanserlerde erken metastaz riskinin daha az olduğu ve genellikle cerrahi tedaviyle kür sağlamanın olası olduğu belirtilmektedir (12).

Larenkste en sık görülen skuamöz hücreli karsinom dışında şu kanserler görülebilmektedir;

- Küçük hücreli karsinom
- Mukoepidermoid karsinom
- Adenokarsinom
- Adenoid kistik karsinom
- Sarkomlar (kondrosarkom, fibrosarkom, rabdosarkom vb.)
- Epidermoid karsinom varyasyonları (12)

Epidermoid karsinom varyasyonları çeşitli derecede diferansiasyon ve stroma özellikleri gösteren yassı epitel hücreli karsinomlardır (62).

İyi huylu larenks tümörleri %5'den azdır. Bunlar arasında papillomlar, kornomlar, miyoblastomlar, lipomlar, hemanjiomlar ve nörofibromlar sayılabilmektedir (22).

2.5.4. Tanı

Glottik larenks karsinomları çoğunlukla ses tellerine yerleştiğinden bu bölgedeki tümörlerin en belirgin belirtisi ses kısılmasıdır (62, 65). Ses kısılmasına neden olması yüzünden erken tanı alan glottik larenks karsinomlarına kıyasla supraglottik larenks karsinomları genellikle geç tanı almaktadır. Çünkü semptomları şüphelidir ve bazı durumlarda boğazda iritasyon bulguları olabilmektedir. Supraglottik tümör zamanla boyutu büyüyünce boğazda takılma hissi, kulak ağrısı ve yutma zorluğu gibi belirtilere yol açmaktadır (16). Ses kısıklığı genelde gözlenmez ancak gözleniyorsa bu durum tümörün transglottik hale geçtiğinin ve daha agresifleştiğinin bir göstergesi olabilmektedir. Subglottik larenks karsinomları ise genellikle hava yolu tıkanıklığı belirtisine yol açmaktadır ve bunlarda da ses kısıklığı kanserin ilerleyen evrelerinde gözlenmektedir (12).

Larenks kanseri tanısında anamnez, fizik muayene, radyolojik inceleme ve endoskopinin yeri vardır. Ancak kesin tanı, biyopsi alınarak histopatolojik inceleme yapılmasıyla mümkün olabilmektedir (22, 66). Biyopsi indirekt larengoskopiyle, fleksibl endoskopiyle alınabilir veya genel/lokal anestezi altında direkt larengoskopiyle alınmaktadır (12, 67). İndirekt larengoskopi larenks aynası kullanılarak uygulanan ve tümörün yeri, uzandığı bölgeler ile vokal kord hareketleri hakkında bilgi sağlayan bir muayene yöntemidir. (22, 68).

2.5.5. Larenks Kanserinde Metastaz

Larenks kanseri direkt yayılım, lenfatik yayılım ile hematojen ve perinöral yollar ile yayılım göstermektedir (12). Larenks kanserli hastalardaki otopsi çalışmalarında %44 hastada uzak metastazın varlığı ile bu metastazların da en fazla akciğer ve kemiklere olduğu saptanmıştır (22).

Supraglottik kanserlerde yayılım preepiglottik boşluk, paraglottik boşluk veya piriform sinüsü tutabilmektedir (22). Supraglottik nükslerin genellikle dil kökünde olduğu belirtilmektedir (69). Herhangi bir bariyer olmamasına rağmen aşağı yönde yayılımın nadir olması bu tümörlerin sadece %1' inin glottise yayılmasından anlaşılmaktadır. Buna karşılık bu bölgenin lenfatik yönden zengin olmasına bağlı olarak lenf nodu metastazları yaklaşık %40' ıdır (65). Tümör yayılımının nadiren gözlemlendiği hiyoid kemik, postoperatif dönemde yutma kolaylığı sağlaması bakımından, supraglottik larenjektomi sırasında korunmaktadır. Ön kommissür tendonu öne yayılımı

engelleyen bir bariyer görevi gördüğünden tiroid kıkırdak tutulumu da son derece nadirdir (17).

Glottik kanserlerde yayılım ventrikül yolu ile paraglottik boşluğa, ön komissürden tiroid kıkırdağa ve subglottik bölgeye olabilmektedir (12).

Subglottik kanserlerde yayılım krikotiroid aralık yoluyla larenks dışına çıkarak tiroidi, özefagusu veya trakeayı hedefleyebilmektedir. Krikoid kıkırdağa da yayılabilmektedir (22, 70).

Transglottik kanserlerde yayılım lenfatik sistem aracılığıyla olmaktadır ve diğer bölgelerdeki metastaza göre daha agresiftir (65).

2.5.6. Evreleme

Larenks kanserli hastalarda tüm dünyada kullanılan TNM evrelemesi, doğru tedavi seçeneklerini belirlerken kullanılmaktadır. İlk olarak 1940' da Denoix tarafından geliştirilen evreleme sistemi daha sonraki yıllarda iki kuruluş tarafından düzenmiştir. 1950' de Union International Counter Cancer (UICC) tarafından düzenlenen TNM evreleme sistemi, 2002'de American Joint Committee for Cancer Staging and End Result Reporting (AJCC) tarafından bir takım değişikliklerle günümüzde de kullanılmaktadır (Tablo 2-3) (71).

TNM sistemi kanserin klinik ve biyolojik özelliklerini içermemekle birlikte adında geçen T 'tümör', N 'bölgesel lenf nodları ile olan metastaz' ve M 'uzak metastaz' anlamına gelmektedir. T evrelemesi için temel olarak tümörün yerleşim bölgesi ile vokal kord hareketliliğine bakılmaktadır. N evrelemesi için lenf nodu boyutuna ve sayısına bakılmaktadır. M evrelemesi için ise boyun ve larenksin dışına ulaşan uzak metastazlara bakılmaktadır (72).

Tablo 2-3: TNM evreleme sistemi

(15, 71) referansları kullanılarak hazırlanmıştır.

Primer Tümör (T) Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor T0: Primer tümör bulgusu yok Tis: Karsinoma in situ
Supraglottis T1: Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, kord hareketleri normaldir T2: Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını veya glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı) tutmuştur, kord hareketleri normaldir T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte vokal kord fiksasyonu vardır ve/veya postkrikoid alan, preepiglottik dokular, paraglottik boşluğa invazedir ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu (iç korteks) vardır T4a: Tümör tiroid kıkırdağı invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara yayılmıştır T4b: Tümör prevertebral boşluğu, karotid arteri veya mediastinal yapıları invaze etmiştir
Glottis T1: Tümör vokal kordlarla sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir) T1a: Tümör tek bir vokal korddadır T1b: Her iki vokal kordda tümör mevcuttur T2: Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmaktadır ve/veya kord hareketleri kısıtlanmıştır T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik boşluğa invazyonu vardır ve/veya minör tiroid kıkırdak invazyonu vardır T4a: Tümör tiroid kıkırdağı invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır T4b: Tümör prevertebral boşluğu invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir
Subglottis T1: Tümör subglottise sınırlıdır T2: Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal T3: Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır T4a: Tümör krikoid veya tiroid kıkırdağı invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır T4b: Tümör prevertebral boşluğu invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir

Tablo 2-4 devamı: TNM evreleme sistemi**Bölgesel Lenf Nodları (N)****Nx:** Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir**N0:** Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur**N1:** En büyük çapı ≤ 3 cm olan tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır**N2:** En büyük çapı 3–6 cm arasında tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır veya

hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır veya

Hiç birinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz vardır

N2a: En büyük çapı 3–6 cm arasında tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır**N2b:** Çapı ≤ 6 cm olan multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır**N2c:** Çapı ≤ 6 cm olan bilateral veya kontralateral lenf nodlarında metastaz vardır**N3:** Bir lenf nodunda >6 cm olan metastaz vardır**Uzak Metastaz (M)****Mx:** Uzak metastazlar değerlendirilememektedir**M0:** Uzak metastaz yoktur**M1:** Uzak metastaz vardır

Evre 0	Tis N0 M0
Evre 1	T1 N0 M0
Evre 2	T2 N0 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

Bazı araştırmacılara göre AJCC tarafından düzenlenen TNM sistemi kanserin klinik ve biyolojik özellikleri hariç sadece morfolojik özelliklerini belirtmesi nedeniyle yetersiz bulunmaktadır (73). Evreleme sırasında klinik muayenenin yanısıra hasta ile ilgili faktörleri, radyolojik değerlendirmeyi ve intraoperatif değerlendirmeyi de içerecek yeni bir sınıflandırmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (74).

TNM evrelemesi yapabilmek için indirekt ve direkt larengoskopik yöntemler ile radyolojik görüntüleme yöntemleri uygulanmaktadır (62). Özellikle teknolojinin gelişmesiyle ortaya çıkan yeni teknikler sayesinde tedavi öncesi larenks kanseri evrelemesi kolaylıkla yapılarak en doğru tedavi seçeneklerinin belirlenmesi mümkün olmaktadır (6, 75). Ayrıca hastanın hangi TNM evresinde olduğunun bilinmesi, sağkalım süresini tahmin etmede de kullanıldığından önem taşımaktadır (32). TNM sistemiyle sağkalımı belirlemede T ve N diğer parametrelere göre daha fazla baz alınmaktadır. Nodal metastazı olan hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı % 29-54 arasında iken, bölgesel metastazı olmayan hastalarda ise % 64–94,5 arasındadır (76). Ayrıca evre yükselmesi ile sağkalım süresi ters orantılı seyretmektedir (10). Yapılan bazı çalışmalarda T1 evredeki hastaların T4 evredeki hastalara göre belirgin olarak daha uzun yaşam süresine sahip oldukları bildirilmiştir (72). Tümörün yerleşim yerine bağlı olarak 5 yıllık sağkalım oranları glottik yerleşimde T1:%90, T2:%85, T3:%60, T4: <%5; supraglottik yerleşimde T1:%85, T2:%75, T3:%45, T4: <%5; subglottik yerleşimde %40 ve transglottik yerleşimde ise %50 olarak belirtilmektedir (3). Glottik kanserler lenfatiklerden fakir olduğu için supraglottik ve subglottik kanserlerden daha az sıklıkla metastaz yaptıkları bilinmektedir (55, 63). Ayrıca tümör çapının ≥ 2 cm olduğu durumlarda metastaz riski %40 olarak bilinmektedir (77).

2.5.7. Larenks Kanserlerinde Tedavide Genel Prensipler

Prognostik faktör olarak larengeal karsinomalarda tümör bölgesi, histolojik derece, evre ve lenf nodu durumu dikkate alınmaktadır. Lenf nodu tutulumu larenks kanserinde en önemli prognostik faktörlerden biridir (78).

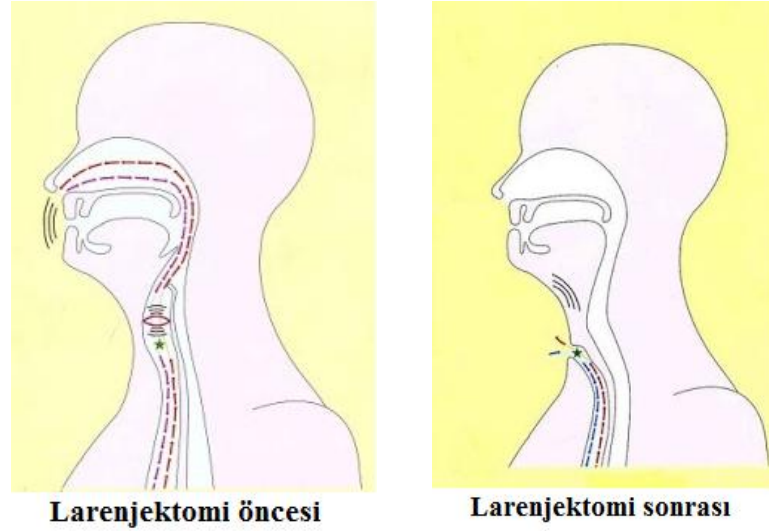
TNM evrelemesi ve histolojik derecelendirme yapıldıktan sonra uygun tedaviyi planlama aşaması gelmektedir. Bu planlama yeterince doğru yapılırsa larenks kanserlerinin baş-boyun kanserleri arasında tedaviye iyi yanıt veren (total kür şansı ortalama %67) kanserlerden olduğu bilinmektedir (10).

Bunun yanı sıra bazı durumlarda, yerleşimi aynı olan tümörlere sahip aynı yaştaki hastalara benzer tedavi girişimi yapılsa da sonuçlar farklı olabilmektedir, bu yüzden TNM evrelemesi ve histolojik derecelendirmenin en doğru tedaviye karar vermede her zaman yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bu sebeple farklı prognostik marker (işaretçi) çalışmaları ile kanser önleyici tedavilerin geliştirilmesi, tümörün biyolojisinin incelenmesi ve larenks kanserindeki metastazların önceden tahmin edilmesi gibi çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu çalışmalar arasında moleküler marker'lar önemli yer tutmaktadır (1, 10, 79). Her tedavi yönteminin avantaj ve dezavantajları mevcuttur, bu yüzden tedaviye karar verilirken, hastanın tedavi sürecinden sonra hayatını zorlaştırmayacağı düşünülen tekniklere öncelik verilerek hastanın yaşam kalitesinin korunması amaçlanmaktadır (80).

Larenks kanserlerinin tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapi tedavisidir.

Kemoterapi tedavisi genellikle ileri evredeki, metastaz yapmış ve diğer tedavilere olumsuz yanıt vermiş larenks kanseri durumlarında cerrahi ya da radyoterapi tedavilerine eşlik edecek şekilde kullanılmaktadır. Özellikle uzak metastaz varlığında önemli bir seçenek olmaktadır (81).

Cerrahi tedavi yöntemlerini başlıca 2 ana gruba ayırmak mümkündür. Bunlar; **Parsiyel Larenjektomi** kendi içinde konservatif tedavi (Larenksin üç ana fonksiyonu olan konuşma, solunum ve yutmaya yardımcı fonksiyonun da korunduğu tedavilerdir) (82) ve nonkonservatif tedavi (Larenksin konuşma ve yutmaya yardımcı fonksiyonlarının korunmasına karşın ağız solunumunun korunamaması nedeniyle hastada kalıcı trakeostomi bırakılan tedavidir) olarak ikiye ayrılmaktadır (16, 22, 80). **Total Larenjektomi** solunum ve sindirim yollarının tam olarak ayrılmasını kapsamaktadır (Şekil 2-5) (16). Larenksin tümünün, hiyoid kemiğin ve üst trakeal halkaların da çıkarıldığı bir teknik olan total larenjektomi kalıcı trakeostomiye de içermektedir. Genellikle ileri evre larenks kanserlerinde tercih edilmektedir (83).



Şekil 2-5: Total larenjektomi sonrası özofagiyal valf yardımıyla konuşma sağlanması

(84)' ten değiştirilerek alınmıştır.

Larenks kanserine erken evrede tanı konmuşsa radyoterapi veya parsiyel larenjektomi gibi tedavi teknikleri kullanılarak aynı zamanda da hastanın larenks fonksiyonları (ses kalitesinin sağlanması, normal yutma fonksiyonunun korunması vb.) yani hayat kalitesi göz ardı edilmeden tedavi sağlanmaktadır. Bu sebeple erken evreli tümörlerde tedavi yönteminin belirlenmesinde tümörün durumu kadar hastanın tercihleri de önem kazanmaktadır. Ancak kanser ileri evredeyse öncelik hastanın sağkalım süresini uzatmak olduğundan larenks fonksiyonları göz ardı edilerek total larenjektomi gibi radikal yöntemlerle tedavi sağlanmaktadır (12, 29, 42).

Erken evrelerdeki (evre 1 ve 2) skuamöz hücreli larenks kanserlerinde cerrahi ve/veya radyoterapi ile %60-80 oranda kür sağlanırken, ileri evrelerdeki (evre 3 ve 4) larenks kanserlerinde bu oran %30 olmaktadır. Ayrıca ileri evre larenks kanserlerinde yapılan cerrahi veya radyoterapi tedavisinin ardından meydana gelen metastaz oranları daha yüksektir (85). İleri evre larenks kanserlerinde kanserin tekrarlama oranlarını düşürebilmek için uygulanan teknikler arasında cerrahi tedaviyi takip eden radyoterapi tedavisi bulunmaktadır. Cerrahi tedavi sonrası uygulanan radyoterapi tedavisinin hem etkili kür sağlamada etkin olduğu hem de kanserin tekrarlama oranlarını düşürdüğü tespit edildiğinden standart teknik olarak kullanılır hale gelmiştir (86). Ameliyat sonrası biyopsi bulgularının iyi olması durumunda bile rutin yapılan larengoskopik kontrollerin, belli dönemlerde tekrarı ve hastanın sigara başta olmak üzere kanserojen maddelerden uzak durması önerilmektedir (87).

2.6. Kök Hücreler

2.6.1. Kök Hücrelerin Tarihçesi

‘Kök hücre’ teriminin terminolojiye kazandırılması ilk olarak kemik iliğindeki bir grup hücrenin kan hücrelerini oluşturmalarının keşfiyle gerçekleşmiştir. Kemik iliğinin bu özelliği sayesinde kan kanseri gibi bir çok hastalıkta sağlıklı bireyden hasta bireye kemik iliği nakilleri ile tedavi imkanı sağlanmıştır. Daha sonraki dönemlerde periferik kandaki kök hücrelerin de aynı amaca yönelik iş görebildiği anlaşılmış ve periferik kök hücre nakli şeklinde tedavide kullanılmıştır (88).

1980’ li yıllarda kordon kanında kök hücrelerin bol olduğu düşüncesi gündeme gelirken, kordon kanı ilk olarak 1992 yılında Dr. David Harris tarafından kendi çocuğundan elde edilip dondurulmuştur. 1994 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde Dünya’ daki ilk kordon kanı bankası kurulmuştur (89).

1998 yılında ilk defa James Thomson tarafından IVF (*in vitro* fertilizasyon) tedavisi gören hastalardan toplanan spermle yumurtaların yapay döllenişi sonucu elde edilen embriyolardan “insan embriyonik kök hücreleri” ayrıştırılmıştır. Proliferasyon ve farklılaşma yetisi bakımından daha önceden keşfedilmiş olan kemik iliği kök hücrelerine kıyasla kapasitelerinin daha iyi olduğu yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır (88).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, herhangi bir dokudan izole edilen kök hücrelerin, gerekli ortam sağlanıp uygun uyaranlarla muamele edildiğinde farklı doku hücrelerine dönüşebildikleri (plastisite özelliği) gösterilmiştir (90).

2.6.2. Kök Hücrelerin Biyolojisi

Sınırsız çoğalabilme, kendini yenileyebilme (self-renewal) özelliklerinin yanında tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) olmak üzere kendilerine özgü 3 önemli özelliğe sahip olan kök hücrelerin her organda bulunduğu düşünülmektedir (7).

Kök hücreler diğer vücut hücreleri gibi rutin görevlerde rol almayıp daha çok ait oldukları doku veya organda meydana gelen hasarı onararak doku veya organın yenilenmesini sağlamak (homeostasis) ve toksinlerin eliminasyonu gibi görevleri üstlenmişlerdir (91).

Kemik iliğindeki kök hücreler hızlı bölünme kapasitesine sahipken derideki kök hücreler yavaş bölünmektedir. Bunlara kıyasla beyinde herhangi bir hasar oluşma azlığı

nedeniyle buradaki kök hücreler genellikle çok yavaş bölünmektedir. Buradan kök hücrelerin bulundukları dokuya göre bölünme hızlarının değişken olduğu sonucunu çıkarmak mümkündür (92).

Terapötik uygulamalar için kök hücrelerin tanımlanması veya karakterizasyonu gibi işlemlerin bazı nedenlerden dolayı zor olduğu bilinmektedir;

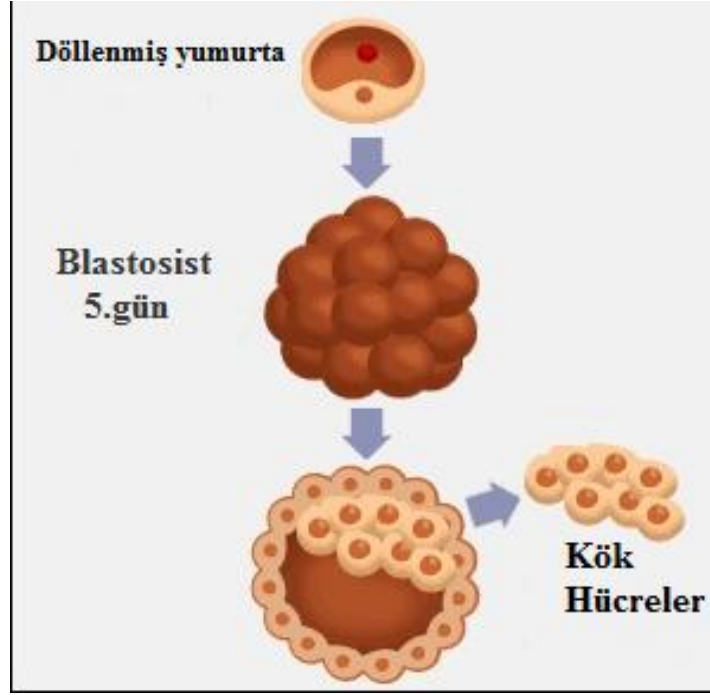
- Normal kök hücrelerinin mutlak sayısı bireyden bireye önemli ölçüde farklılık göstermektedir.
- Normal kök hücreler ile farklılaşmış hücreler arasındaki ya da kanser kök hücre ile tümör dokusunda bulunan diğer kanser hücreleri arasındaki oran değişkendir.
- Kanser kök hücrelerinin histolojik kökeni bu konuda ortaya atılan hipotezler olmasına rağmen belirsizdir (91).

Farklılaşma kapasitesi göz önüne alındığında kök hücreleri totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve multipotent kök hücreler şeklinde 3 sınıfa ayırmak mümkündür (92, 93).

2.6.2.1. Totipotent Kök Hücreler

Totipotent kök hücreler kendi başına bir organizmayı oluşturabilecek potansiyele sahip hücrelerdir (93). Embriyonik kök hücreler totipotent özellikleri sayesinde bir canlının baştan sona gelişimini sağlayabilecek kapasiteye sahiptirler (94). Embriyonun içinde yer alan embriyonik bileşenler blastosistin iç hücre kütlesi anlamına gelip embriyonun, fetüsün ve yetişkin organizmanın tüm organlarının oluşturulmasını sağlamaktadır (95).

Embriyo, farklılaşıp özelleşmiş 200' e yakın hücre çeşidini içeren kompleks bir canlıyı oluşturabilecek genetik bilgiye ve kapasiteye sahiptir (Şekil 2-6). Ancak bu embriyo döllenmeden sonraki 5.gün olan blastula evresine kadar totipotent olup, sonrasında bu özelliği değişmektedir.



Şekil 2-6: Blastosist içinde bulunan kök hücreler

(96)' dan değiştirilerek alınmıştır.

İç hücre kütleşi ayrıca embriyonik kök hücre kaynağıdır ve 3 embriyonik germ tabakasının kökenidir;

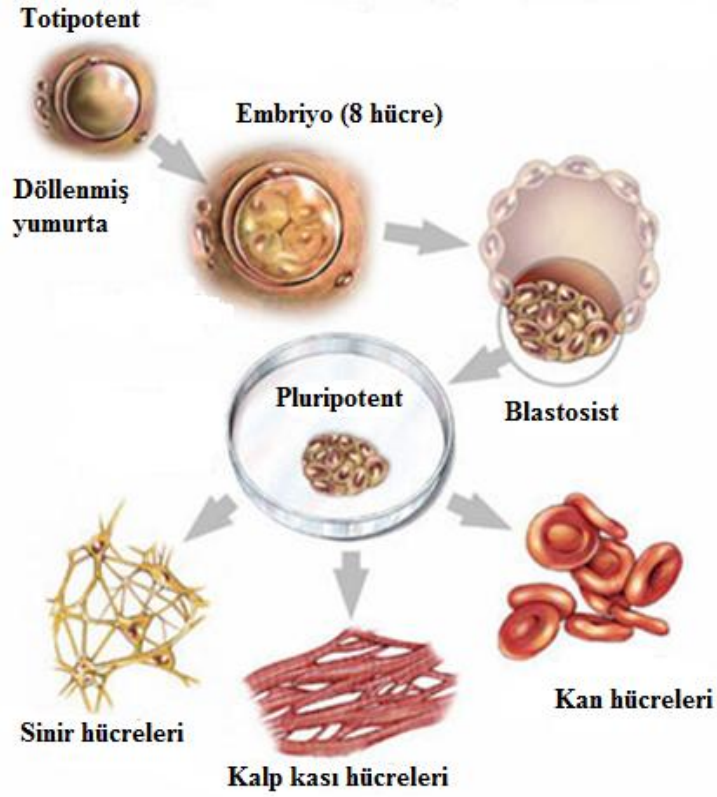
- ektoderm (epidermal doku ve sinir sistemi)
- endoderm (sindirim sistemi, akciğerler)
- mezoderm (kas, kemik, kan, ürogenital sistem) (97, 98).

2.6.2.2. Pluripotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler, tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak kapasiteye sahip olmamalarına rağmen bilinen yaklaşık 200 hücre çeşidine farklılaşabilme kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Döllenme sonrası 5. günden itibaren oluşan hücrelerin yaptığı küresel şekil olan **blastosist** içerisinde yer alan hücreler pluripotent özelliktedirler (93, 99).

Embriyonik gelişmenin ilerleyen aşamalarında iç hücre kütleşinin embriyonik kök hücreleri sadece vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebildiğinden totipotent özelliklerini kaybederek pluripotent özellik taşımaktadır (Şekil 2-7). Bu pluripotent özellik ise somatik kök hücrelerin oluşmasıyla dokuya özgü multipotent özelliğe dönüşmektedir.

Yani gelişmenin devamı ile birlikte kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinde bir azalma olduğunu söylemek mümkündür (92).

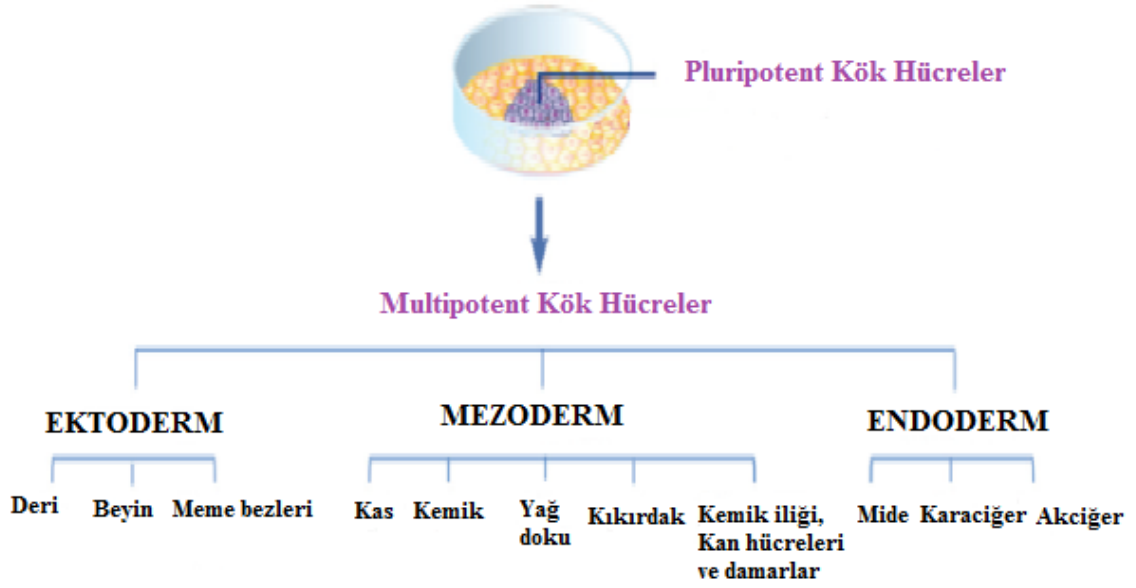


Şekil 2-7: Totipotent ve pluripotent hücreler

(100)' den değiştirilerek alınmıştır.

2.6.2.3. Multipotent Kök Hücreler

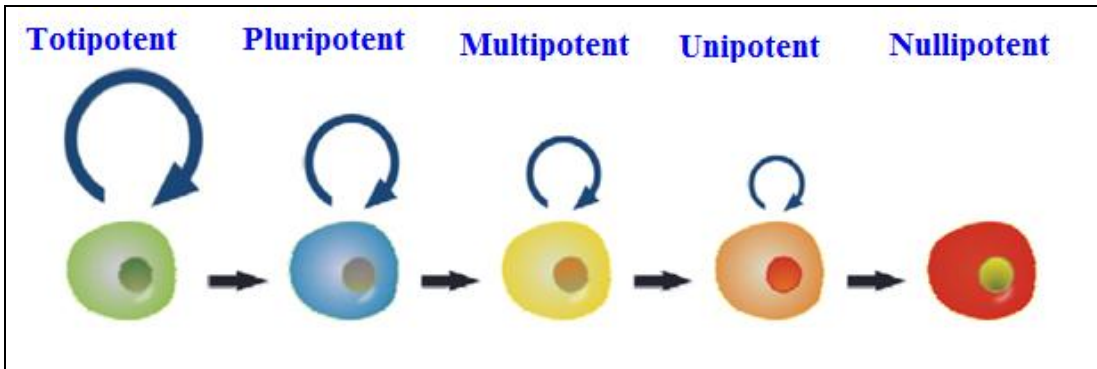
Bulunduğu doku ve organdaki hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip olmasına karşın diğer hücre tiplerine farklılaşamayan hücrelere ise multipotent kök hücre denilmektedir (Şekil 2-8). Embriyonik gelişmenin ilerleyen safhalarında hücrelerin bir kısmı pluripotent özelliklerini korurken bir kısmı ise multipotent hücrelere dönüşmektedir. Erişkin kök hücreler multipotent özellik taşımaktadır. Kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreleri erişkin kök hücrelerdir ve kan hücrelerinde (trombosit, lökosit, eritrosit) hasar olduğunda bunlara farklılaşabilmektedir. Multipotent hücreler doğum sonrası düşünüldüğünde kordon kanında, kemik iliği ve yağ dokusunda bulunmaktadır (93, 101).



Şekil 2-8: Multipotent özellikteki kök hücrelerin oluşturduğu embriyonik tabakalar ve bunlardan köken alan yapılar

(102)' den değiştirilerek alınmıştır.

Ayrıca, multipotent kök hücreler daha özel hale gelerek sadece tek bir hücre hattına farklılaşabilen **unipotent kök hücreleri** oluşturmaktadır. Unipotent kök hücrelerin farklı dokular için işlevi hücre rezervi olarak hareket etmektir. Unipotent kök hücrelerden köken alarak da oldukça farklılaşmış ve kendini yenileme yeteneklerini kaybetmiş olan **nullipotent hücreler** oluşmaktadır (Şekil 2-9) (103).



Şekil 2-9: Farklı derecelerde farklılaşma potansiyeline sahip kök hücreler (Kök hücre plastisitesi)

(102)' den değiştirilerek alınmıştır.

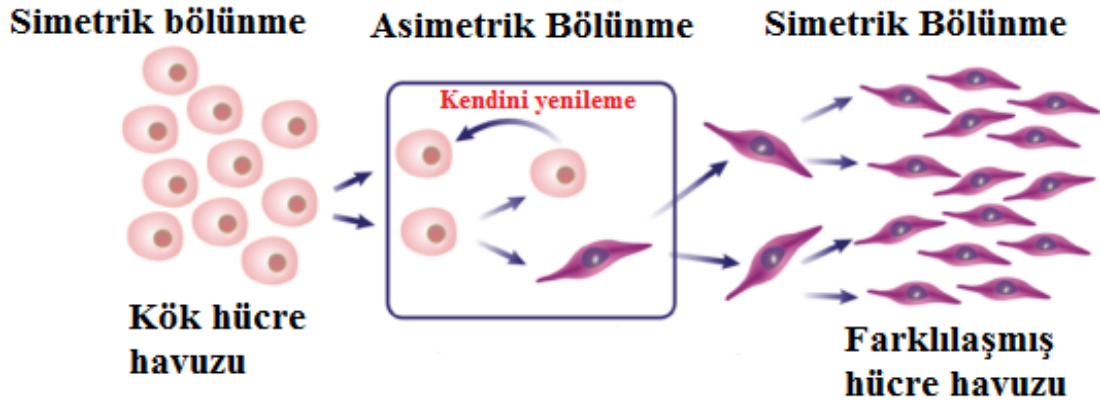
Doku bütünlüğü, düzenli olarak farklılaşan ve ölen hücrelerin sürekli değiştirilmesiyle sağlanmaktadır. Bu yüzden çoğu yetişkin dokuda progenitör (öncü) hücre havuzları vardır. Bunlar farklılaşmamış hücrelerin rezervini sağlarken aynı zamanda çoğalma ve farklılaşma yoluyla özelleşmiş dokunun kökenini de oluşturmaktadır. Bu yetişkin progenitör hücreler, yetişkin dokuya spesifik kök hücre veya somatik kök hücreler olarak tanımlanmaktadır (102).

Özetlenecek olursa kök hücreler vücuttaki diğer hücrelerden farklı olarak şu ana özellikleri taşımaktadır;

- Farklılaşmamış ve özelleşmemiş hücrelerdir.
- Özel bir dokunun spesifik hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler.
- Farklılaşmadan kalarak uzun süre çoğalmayı başarabilmektedirler.
- Özelliklerini kaybetmeden transplante edilebilirler.
- Telomeraz enzim aktivitesine sahiptirler.
- Asimetrik olarak bölünebilirler.

Bu özelliklerin birleşimi, genel olarak ‘**stemness**’ olarak adlandırılmaktadır. Kanseri kök hücrelerin de ‘stemness’ özelliklere sahip olduğu ve tüm bu özelliklerin sağlıklı kök hücrelerle aynı yollar üzerinden düzenlendiği bildirilmiştir (104).

Kök hücreler, simetrik ve asimetrik olarak bölünebilmektedir (Şekil 2-10). Embriyonik gelişim ya da dokusal onarım gibi bir durum nedeniyle kök hücre havuzundaki hücre sayısının artırılması gerektiğinde asimetrik bölünmeyle bir kök hücrenin bölünmesi sonucunda oluşan hücrelerden biri herhangi bir uyarana gelene dek sessiz kalırken diğeri ise progenitör hücreye dönüşmektedir. Progenitör hücreler üzerinden gerekli olan farklılaşmalarla doku tamiri gibi işlemler gerçekleştirilmektedir (105).



Şekil 2-10: Simetrik ve asimetrik bölünme

(102)' den değiştirilerek alınmıştır.

Gerekli uyarı gelince sessiz dönemden ayrılan kök hücreler iç ve dış uyarıcı sinyallerin etkisiyle kendini yenilemektedir veya progenitör hücreye farklılaşmaktadır. Pozitif ve negatif yönde olan bu düzenleyici sinyal yolları arasında bir denge vardır. TGF- β yolağı kök hücre çoğalmasında negatif düzenleyiciyken; Wnt, Notch ve Sonic Hedgehog sinyal yolları ise kök hücrelerin kendini yenilemesinde pozitif düzenleyicilerdir (Şekil 2-11). Bu sinyal yollarında oluşabilecek olan herhangi bir değişimin kansere öncülük edebileceği öngörülmektedir (102).

	Notch	Wnt	Hedgehog	TGF- β
Kök Hücreler	+	+	+	+
Karsinogenez	+	+	+	+
Kök hücrelerin kendini yenilemesinin korunması	+	+	+	-
Kök hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	+	+	-	-
Kök hücre proliferasyonunun düzenlenmesi	+	+	-	-
Progenitör hücre farklılaşmasında rol oynama	-	-	+	+
Kök hücrelerin sessizliğinin korunması	-	-	-	+
Progenitör hücre proliferasyonunun düzenlenmesi	-	+	+	+

Şekil 2-11: Kök hücreleri etkileyen sinyal yolları

(106)' dan değiştirilerek hazırlanmıştır.

2.6.3. Kök Hücre Çeşitleri

Elde edildikleri kaynak dokulara göre kök hücreler embriyonik kök hücre, fetal kök hücre, erişkin kök hücre ve kanser kök hücre olmak üzere 4 çeşittir.

2.6.3.1. Embriyonik Kök Hücreler

Blastosistin iç hücre kütesinden alınan totipotent özellikteki embriyonik kök hücrelerin telomer boyları oldukça uzundur. Embriyonik kök hücreler çok hızlı çoğalma ve çok fazla hücre tipine farklılaşma kapasitelerine sahiptir (107-109). İnsan embriyonik kök hücreleri koloniler oluşturarak çoğalabilmektedir. Ayrıca farklılaşmamış kök hücrelere ait olan işaretçiler (Oct-4, Sox-2, Klf-4 ve Nanog) gibi transkripsiyon faktörleri ile alkalın fosfataz gibi yüzey proteinlerini eksprese etmektedirler (102). Kültür ortamına bazı büyüme faktörleri verilerek embriyonik kök hücrelerin istenilen yönde farklılaşmasını sağlamak için çalışmalar yapılabilmektedir ancak tedaviye yönelik embriyonik kök hücrelerle araştırma yapılmasına dair etik açıdan sorunlar vardır (110).

2.6.3.2. Fetal Kök Hücreler

Pluripotent özellikte olan fetal kök hücreler fetüslerden elde edilmektedir. Tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak kapasiteye sahip olmamalarına rağmen pluripotent özellikleri sayesinde bilinen tüm hücre çeşitlerine farklılaşabildiklerinden bilimsel çalışmalarda embriyonik kök hücrelerin alternatifi olabilmektedirler. Embriyonik kök hücrelere kıyasla daha yavaş çoğalma kapasitesine sahip olan fetal kök hücreler, habitüel abortus (düşük) sonucu veya bazı hastalıklara bağlı olarak gebeliğe son verilmesiyle elde edilen fetüslerden izole edilebilmektedir (98, 111).

2.6.3.3. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler embriyonik kök hücrelere kıyasla daha yavaş çoğalma ve daha az hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir (109). Erişkin kök hücreler kendilerini yenileyebilir ve bulundukları dokularda herhangi bir hasar meydana geldiğinde tahrip olan veya ölen hücrelerin yerine yenilerini yapmak için farklılaşabilirler. En çok bulundukları yer kemik iliği olup göz, karaciğer, deri, kas ve sinir gibi dokularda da bulunabilirler. Hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler de erişkin tip kök hücrelerdendir (112, 113).

2.6.3.4. Kanser Kök Hücreler

Karsinogenez ile ilgili ortaya atılan kanser kök hücre teorisi dış ya da iç etkenlerin kök hücrelerde kalıtsal ve/veya kazanımsal olarak genetik hasara yol açması sonucu embriyonik gelişim sırasında bu hücrelerin yanlış yerleşmiş olabileceği ve bu hasar almış kök hücrelerin kendi kök hücre özelliklerini koruyarak canlının yaşamının ilerleyen zamanlarında tümör gelişimi ile metastazından sorumlu oldukları ve ayrıca tümör hücrelerini günümüzde kullanılan tedavi tekniklerine karşı dirençli hale getirme potansiyeline de sahip oldukları esasına dayanmaktadır (114-117).

Kök hücrelerde meydana gelen genetik değişikliklerin kanser kök hücre (KKH) oluşumuna yol açmasının mikroçevrelerindeki sıkı kontrolden bu durumun kaçmasıyla mümkün olduğu ileri sürülmektedir (7). Onkogenik mutasyonların kök hücreleri diğer hücelere kıyasla daha fazla hedefleyebileceği düşünülmektedir. Bu düşünce, uzun ömürlü-farklılaşmamış kök hücrelerin diğer farklılaşmış hücelere kıyasla genotoksik strese daha fazla maruz kalmasından ileri gelmektedir. (118).

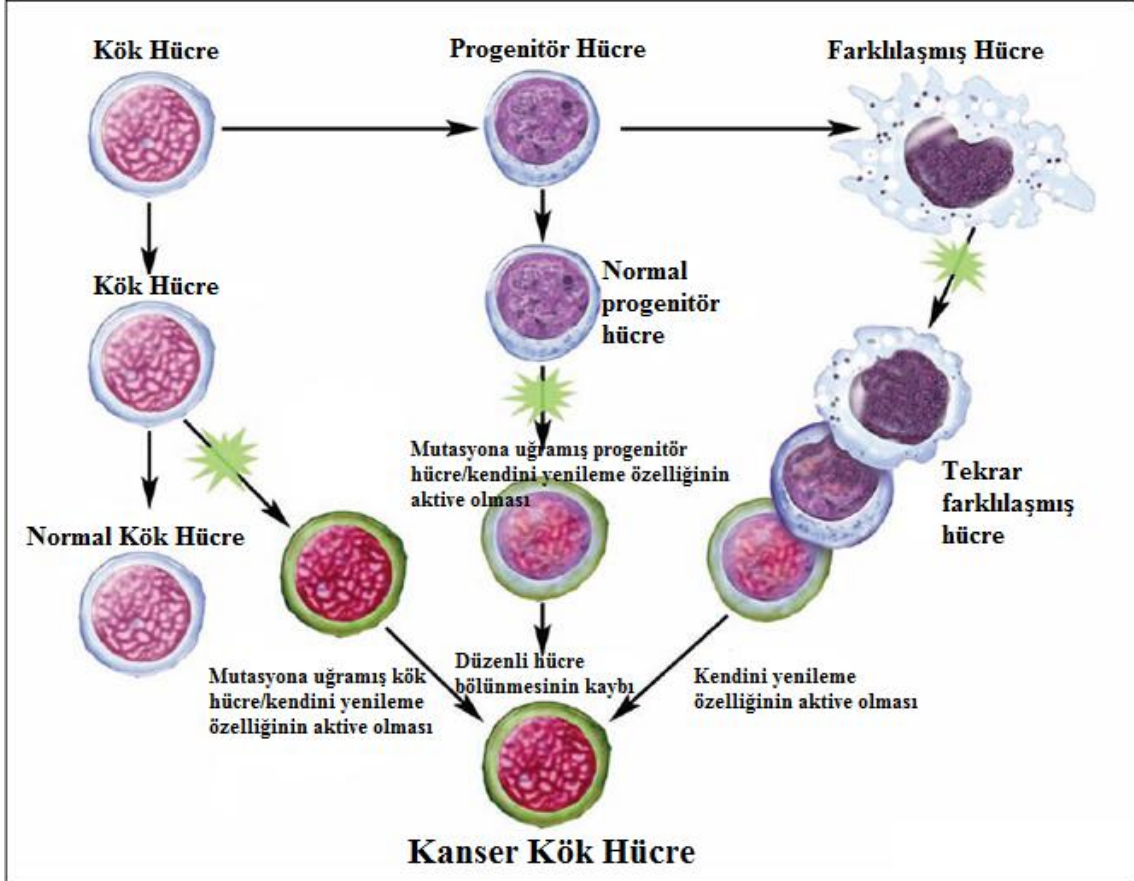
Kanser kök hücreler Tablo 2-4' te gösterildiği üzere normal kök hücreler ile benzer özelliklere sahiptir.

Tablo 2-5: Kanser kök hücrelerin normal kök hücreler ile benzer özellikleri

(99, 119) kaynaklarından yararlanılarak oluşturulmuştur.

	Normal kök hücreler	Kanser kök hücreler
Kendini yenileme	+	+
Farklı hücre tiplerine farklılaşabilme	+	+
Oct4, Nanog, Klf4, Sox-2 gibi transkripsiyon faktörlerini içermesi	+	+
Belli sinyal yollarından etkilenme (Wnt, Notch ve TGF- β vb.)	+	+
Telomeraz enzim aktivitesi	+	+
ABC taşıyıcı proteinleri sayesinde kemoterapötiklere direnç	+	+
Aktif DNA onarım mekanizması	+	+
Apoptoza direnç	+	+

Bir diğer teori klonal evrim teorisidir. Buna göre karsinogenez, kendini yenileme özelliğini tekrar kazanan progenitor hücrelerin herhangi bir sebeple KKH' ne dönüşümünden veya somatik hücrelerde meydana gelen genetik anormalliklerin birikiminden kaynaklanmaktadır (Şekil 2-12) (112, 120).



Şekil 2-12: Kanser kök hücrelerin kökeni ile ilgili ortaya atılan görüşler

(121)' den değiştirilerek hazırlanmıştır.

1977 yılında bazı araştırmacılar yaptıkları biyoanalizlerde malign lezyonların çokça büyümesini, sınırsız bölünme gibi kök hücre özelliklerini taşıyan kanser kök hücrelerin varlığına bağlamışlardır (122). 1983 yılında Mackillop 'her tümörün fonksiyonel olarak tam bir kök hücre özelliğinde olan kanser kök hücre popülasyonu içerdiği' şeklindeki görüşünü ortaya atmıştır (123).

Kanser kök hücrelerin tümör kitlesindeki hücrelerin yaklaşık %0,3-2' sini oluşturduğu görüşü yaygındır (91). Kanser kök hücre popülasyonundaki az sayıdaki hücrenin bile kanseri başlatarak kanser hücrelerini çoğaltmada yeterli olabileceği

belirtilmiştir (124). Kanser kök hücreleri kendini yenileyebilme yetenekleri, yavaş hücre bölünmesine sahip olmaları, birçok farklı hücreye farklılaşabilmeleri, herhangi bir tümörü başlatabilme yetenekleri, kendilerine özgü detoksifikasyon enzim sistemleri olması, moleküler hücre yüzey işaretçileri ve embriyonik sinyal yollarına sahip olmaları sayesinde oldukça özel hücrelerdir (118, 125). KKH varlığı ilk olarak akut lenfoblastik lösemide gösterilmiştir (126). Daha sonra beyin (127), meme (128), kolon (129), pankreas (130), prostat (131), akciğer (132) ve baş-boyun (133) kanseri gibi çeşitli solid tümörlerde de KKH varlığı yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir.

Larenks kanser kök hücreleri ile alakalı çalışmalar Hep-2 hücre hattı ile yapılan çalışmalarla sınırlıdır. 2008 yılında Wei ve arkadaşları tarafından Hep-2 hücre hattında CD133'ün olası kanser kök hücresi işaretçisi olarak incelenmesine yönelik bir çalışma yayınlanmıştır. Araştırmacılar Hep-2 hücre hattında oldukça sınırlı sayıda bir hücre grubunun yüzeyinde CD133 taşıdıklarını ve bu hücre grubunun belirgin bir şekilde tümör formasyonu kapasitesine sahip olduklarını *in vivo* olarak gösterdiklerini bildirmişlerdir (134). Wan ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir diğer çalışma ise larenks kanseri hücre hatlarında 'yan popülasyon' karakterizasyonu ile ilgili olup araştırmacılar yine Hep-2 hücre hattında yüksek kendini yenileme, proliferasyon, radyoterapi direnci ve tümörojeniteye sahip olan bir yan popülasyonun (side population) varlığını gösterdiler (135). 2011 yılında Wu ve arkadaşları Hep-2 hücre hattında CD133-PE antikoru kullanarak FACS sistemi aracılığıyla ayrıştırma sağlamıştır. Bu CD133+ ve - hücrelerde küre oluşturma ve ilaç duyarlılığı gibi deneyler yapılmıştır. CD133+ hücrelerde CD133- hücrelere kıyasla daha fazla küre oluşumu ve ilaçlara daha fazla direnç gözlenmiştir (136). 2012 yılında Wu ve arkadaşları tarafından Hep-2 hücre hattından CD133 ile ayrıştırılan hücreler, NOD/SCID farelere enjekte edilerek bu hücrelerin tümör oluşturma kapasitesine sahip oldukları gösterilmiştir (137). 2013 yılında Wei ve arkadaşları tarafından Hep-2 hücre hattındaki CD133+ hücrelerin biyolojik karakterleri incelenmiş ve sonuç olarak CD133+ hücrelerin CD133- olan hücrelere kıyasla kemoterapötiklere daha fazla dirençli oldukları ve radyoterapi sonrası büyüme inhibisyonlarının ise daha az olduğu gösterilmiştir (138).

Tümördeki farklılaşmış hücreler tümör kütlelerini oluşturmaktadır fakat kendini yenileme özellikleri olmadığından ve sınırlı çoğalma potansiyellerinden dolayı yeni bir tümör oluşturamazlar. Buna bağlı olarak tümör dokusu içinde aynı zamanda tümörü oluşturabilme yeteneğine sahip kanser kök hücrelerin varlığı birçok çalışmada kabul görmektedir (139).

2.6.4. Kanser Kök Hücrelerinde Tedaviye Direnç

Günümüzde kullanılan kanser tedavi tekniklerinde tümörün küçültülmesi hedeflenmektedir. Oysa tümörün devamlılığını sağlayan kanser kök hücreler yok edilmediğinde kanserin tekrarlama riski devam etmektedir (115). Ayrıca farklı tip kanserlerde yapılan çalışmalarda kanser kök hücrelerin günümüzde tedavide kullanılan ilaçlara direnç gösterdikleri bildirilmektedir (116).

Kanser kök hücrelerinin tedaviye direnç sağlamasında etkili olduğu düşünülen mekanizmalar şöyle özetlenebilir;

- Kanser kök hücreler, kendilerine zarar verebilecek tüm kimyasalların seçici olarak hücreden atılımını sağlayan ilaç dışlama pompalarına sahiptir. Bu sayede DNA bütünlüğünü kolayca koruyabilmektedirler. ATP-bağlayıcı kaset (ABC) süper ailesinin üyeleri KKH' de ilaç dışlama pompaları olarak iş görmektedir (140). Bu sayede KKH' lerde toksik ajanlar hücre dışına kolayca atılabildiğinden tedaviye dirençli hücreler oldukları düşünülmektedir (141).
- DNA hasarlarına ve mutasyonlara karşı çok güçlü olan tamir mekanizmaları sayesinde KKH' lerin , tedavide kullanılan radyasyon ve kemoterapötik ajanlara karşı direnç gösterip oluşan hasarı hızla onarabildikleri bazı çalışmalarla gösterilmiştir (142).
- Kanser kök hücrelerin bir kısmı asimetric bölünme sonrası sessiz durumda kalmaktadır. Tedaviye direnci bu sessiz durumdaki hücrelerin oluşturabileceği öngörülmektedir (143).
- Kanser kök hücrelerin özelleşmiş mikroçevrelerinin (nişlerinin) de davranışlarını etkilediği düşünülmektedir. Serbest radikallerden korunabilmek için oksijenden fakir bir mikroçevreye yerleşmeleri beklenen KKH' lerin tam tersine oksijenden zengin kan damarları yakınına yerleştikleri çalışmalarla gösterilmiştir (144). Yapılan çalışmalarla baş-boyun kanserlerindeki kanser kök hücrelerin normal

kök hücrelere benzer şekilde artmış antioksidan koruma sistemine sahip oldukları bulunmuştur (145). Böylece hem oksijenden zengin bir mikroçevrede yerleşip hem de nasıl serbest radikallerden korunabildikleri açığa kavuşmuştur.

- Wnt sinyal yolağının kanser kök hücrelerin hayatta kalmalarıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (146).
- Kanser kök hücrelerin apoptoz mekanizmalarına karşı direnç sağladığı için tedaviye direnç gösterdiği de düşünülmektedir (147).

2.6.5. Kanser Kök Hücreleri İzole Etmede Kullanılan Günümüz Metodları ve Yüzey İşaretçileri

Kanser kök hücrelerini belirlemek ve ayırtmak için günümüzde kullanılan 4 ana metod vardır. Bunlar;

- Hoechst 33342 boyası kullanılarak yan popülasyon fenotipinin tespiti (148).
- Küre (sphere) oluşturarak kanser kök hücrelerin zenginleştirilmesi (149).
- Aldehit dehidrogenaz (ALDH) aktivite analizinin yapılması (150).
- Kanser kök hücrelerin yüzey işaretçileri kullanılarak ayırtılması (151).

2.6.5.1. Hoechst 33342 Boyası Kullanılarak Yan Popülasyon Fenotipinin Tespiti

Hoechst 33342 (Hoe) ile yan popülasyon tayini kullanılan yöntemlerden biridir (152). Kök hücre işaretçilerini yüksek düzeyde eksprese eden yan popülasyon hücreleri farklılaşma işaretçilerini ise düşük düzeyde eksprese etmektedir (153). Bu nedenle çalışılan kök hücrelere spesifik hücre yüzey işaretçisi bulunmadığı durumlarda yan popülasyon hücrelerinin karakterizasyonu faydalı bir araç olabilmektedir. Yan popülasyon, kemik iliği (154), akciğer (155), karaciğer (156) gibi çeşitli dokulardan kök hücreleri tanımlamak ve izole etmek için kullanılmıştır.

2.6.5.2. Küre (Sphere) Oluşturarak Kanser Kök Hücrelerin Zenginleştirilmesi

Küre oluşturma deneyi (Sphere Formation Assay), kök hücre özelliğindeki hücrelerin düşük bağlanma kapasiteli flaska FBS içermeyen epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) içeren besiyeri ortamında kültür edilerek ortak bir hücreden köken alıp hücre kolonileri oluşturmaları esasına dayanmaktadır. Oluşturulan bu küreler (hücre kolonileri), daha sonrasında deneylerde kullanılmak için pasajlanarak çoğaltılabilmektedir. Oluşan koloniler toplanıp akım

sitometri yöntemiyle incelenenerek bu hücrelerin farklılaşarak hangi tip hücre serisini oluşturduğu anlaşılabilmektedir (157). Beyin ve kolon gibi kanser hücrelerinden ayrıştırılan CD133+ hücrelerin küreler meydana getirerek büyümeyi başardıkları gözlenmiştir. Buna kıyasla CD133- hücrelerin ise bunu başaramadığı gösterilmiştir (127).

2.6.5.3. Aldehit dehidrogenaz (ALDH) Aktivite Analizinin Yapılması

Aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzim ailesi hücre içi aldehitlerin oksidasyonundan sorumlu olan ve erken kök hücre farklılaşmasında retinol'ün retinoik asit'e oksidasyonuna katkı sağlayan enzimlerdir. Ayrıca gelişim sırasında kök hücrelerin kendini korumasında rol oynayarak hücrel farklılaşmayla bağlantılı bulunmuştur (158). Artmış ilaç dışlama kapasitelerine ek olarak kanser kök hücreler Aldehit dehidrogenaz (ALDH) gibi aracı moleküller eksprese ederek bazı kemoterapötik ajanları inaktif hale getirebilmektedir. Bu sayede ALDH'ın, meme ve kolon kanseri gibi çeşitli dokulara ait hücre hatlarında kemoterapötik ajanlara direnç sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca dirençli kolorektal kanser kök hücrelerinde ALDH'ın ekspresyonunun susturulması sonucu bu direncin azaldığı gözlenmiştir (159). Artmış ALDH ekspresyonu baş-boyun skuamöz hücreli karsinom dahil olmak üzere çok sayıda kanserde kötü prognozla bağlantılı bulunmuştur (139).

2.6.5.4. Kanser Kök Hücrelerin Yüzey İşaretçileri Kullanılarak Ayrıştırılması

Kansere karşı daha yeni ve daha etkili tedavi imkanları sağlamak için kanser kök hücrelerini moleküler düzeyde ayırtmak ve karakterize etmek son derece önem arz etmektedir. Kanser kök hücrelerini ayırtmada CD44, CD24, CD29, CD90, CD133, integrin-alfa-2 beta-1, epitelyal spesifik antijen ve aldehit dehidrogenaz-1 (ALDH1) gibi yüzey işaretçi proteinleri kullanılmaktadır. Bunların arasında sıklıkla kullanılanlar CD133 ve CD44' tür (128, 139, 160).

- **CD133 yüzey işaretçi proteini**

CD133, 117 kDa moleküler ağırlığında ve hücre çıkıntılarına lokalize olan bir transmembran glikoproteindir. CD133'ün görevsel özellikleri tam olarak karakterize edilememiş olmasına rağmen bu molekülün kolesterol ile etkileştiği ve plazma membran organizasyonuna katıldığına dair düşünceler vardır (161).

CD133 geni 4p15 kromozomal yerleşime sahiptir ve sinonim isimleri PROM1 (Prominin 1), AC133, CORD12 ve RP41' dir (162). CD133 (Prominin 1) geni 4349 bazdan ve 27 ekzondan oluşan bir gen olup 856 aminoasit içermektedir (163).

CD133 proteini ilk olarak fare nöroepitelyal kök hücrelerinde tanımlanmıştır (164). CD133+ hücreler açısından zenginleştirilmiş hücre popülasyonlarının artmış kendini yenileme kapasitesine ve birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (151). Ayrıca CD133' ün hem normal kök hücreler için hem de kanser kök hücre için hücre yüzey işaretçisi olduğu bilinmektedir. Larenks kanserinde kanser kök hücrelerinin karakterizasyonu Hep-2 hücreleri ile yapılan fonksiyonel çalışmalarla sınırlı olmasına rağmen, CD133 larenks kanserindeki kanser kök hücreleri için de olası işaretçi olarak önerilmiştir (134, 165). CD133+ Hep-2 hücrelerinin *in vivo* ve *in vitro* ortamda kemoterapiye artmış direnç göstermelerine ek olarak yüksek klonojenik potansiyel gösterdikleri de tespit edilmiştir (165, 166).

- **CD44 yüzey işaretçi proteini**

CD44, 11p13 kromozomal yerleşime sahip bir gendir ve sinonim isimleri CD44R, chondroitin sulfate proteoglycan 8, CSPG8, HCELL, hematopoietic cell E- and L- selection ligand, IN, MC56 ve Pgp1' dir (167). CD44 geni 3046 bazdan ve 18 ekzondan oluşan bir gen olup 742 aminoasit içermektedir (168).

Meme, kolorektal, baş ve boyun kanseri dahil olmak üzere çok sayıda kanserde kanser kök hücre antijeni olarak tanımlanan CD44 büyük ve glikozillenmiş bir transmembran proteindir. İşlevleri ile ilgili olarak hücre yapışması, sinyalizasyon, göç ve reaktif oksijen türlerine karşı savunma gibi durumlarda rol oynadığı bilinmektedir (169). Larenks kanserinin radyoterapi ile tedavisinden sonra artmış CD44 ekspresyonunun nüks ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (170).

- **CD34 yüzey işaretçi proteini**

CD34, 115 kDa moleküler ağırlığında bir transmembran proteini olup hematopoietik kök hücreler ve çeşitli organlarda eksprese edilmektedir (171). CD34 geni, 1q32 kromozomal yerleşime sahiptir (172). CD34 geni 2874 bazdan ve 8 ekzondan oluşan bir gen olup 328 aminoasit içermektedir (173).

Kök hücrelerin genel olarak CD34 yüzey proteini taşımadıkları da belirlenmiştir. Hücrelerin bu özelliklerinden faydalanarak negatif ayırma tekniği ile CD34 taşımayan hücrelerin diğerlerinden ayrılması sağlanabilmektedir (174).

- **Yüzey İşaretçileri Aracılığıyla Kanser Kök Hücrelerin Ayırıştırılmasında İmmünomanyetik Yöntem Kullanılması**

Son yıllarda tümör içindeki hücre popülasyonlarını ve buna direkt kıyaslama olanağı sağlaması için tümör hücre popülasyonuna denk gelen normal hücre popülasyonlarını ayırtmak için manyetik nanoparçacık ayırıştırma teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır. İmmünomanyetik ayırıştırma teknikleri, hücelere antikor veya lektin gibi ara moleküller aracılığıyla manyetik nanoparçacıkların bağlanması esasına dayanmaktadır. Nanoparçacıklarla işaretli hücreler daha sonrasında manyetik ortama yerleştirildiğinde işaretlenmemiş hücrelerden kolayca ayrılabilir. Bu manyetik nanoparçacıklar hücre ayırıştırması için oluşturulabildiği gibi bazı moleküllerin (örneğin nükleik asitlerin) pürifikasyonu için de dizayn edilebilmektedir (175).

Ayırıştırılması istenilen hücre tipine spesifik bir antikor yoksa bu durumda **negatif ayırıştırma** adı verilen teknik kullanılabilir. Bu teknikte sadece ayırıştırılması istenen hücre grubu işaretlenmediğinden manyetik alanda diğer işaretli hücrelerden kolayca ayırıştırılmaları sağlanmaktadır (176). Diğer ayırıştırma tekniği olan **pozitif ayırıştırma** ise ayırıştırılması istenen hücre grubu spesifik antikorlara bağlı nanoparçacıklar ile işaretlenerek, immünomanyetik işaretleme yapılmamış (ayırıştırılması istenmeyen) hücre grubundan ayırıştırılmaktadır (176).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

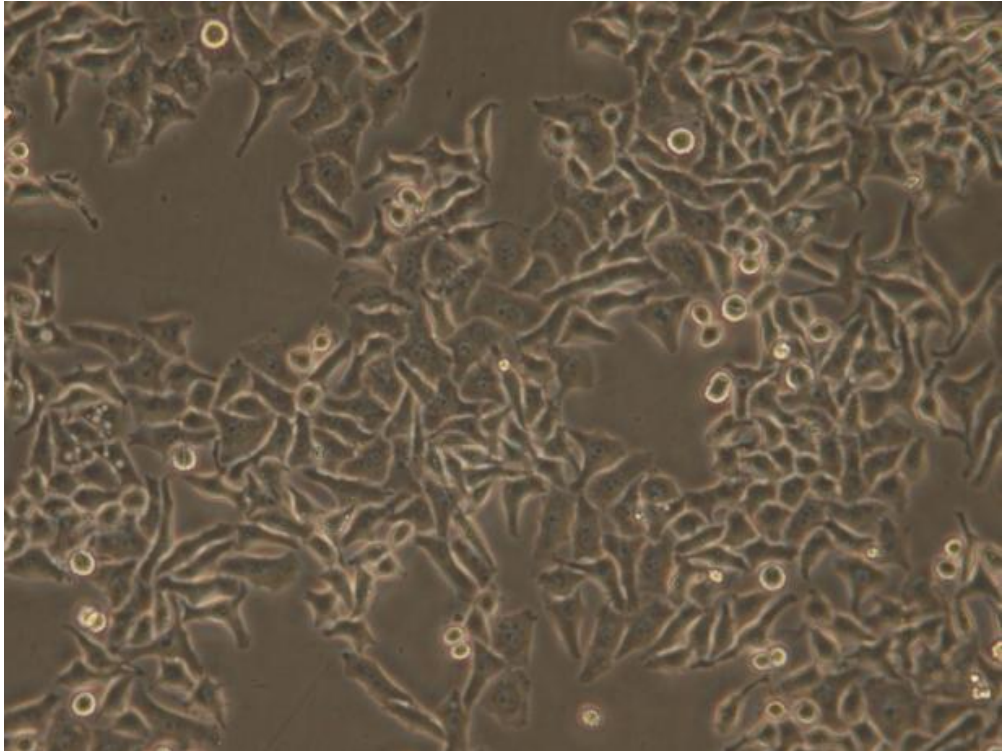
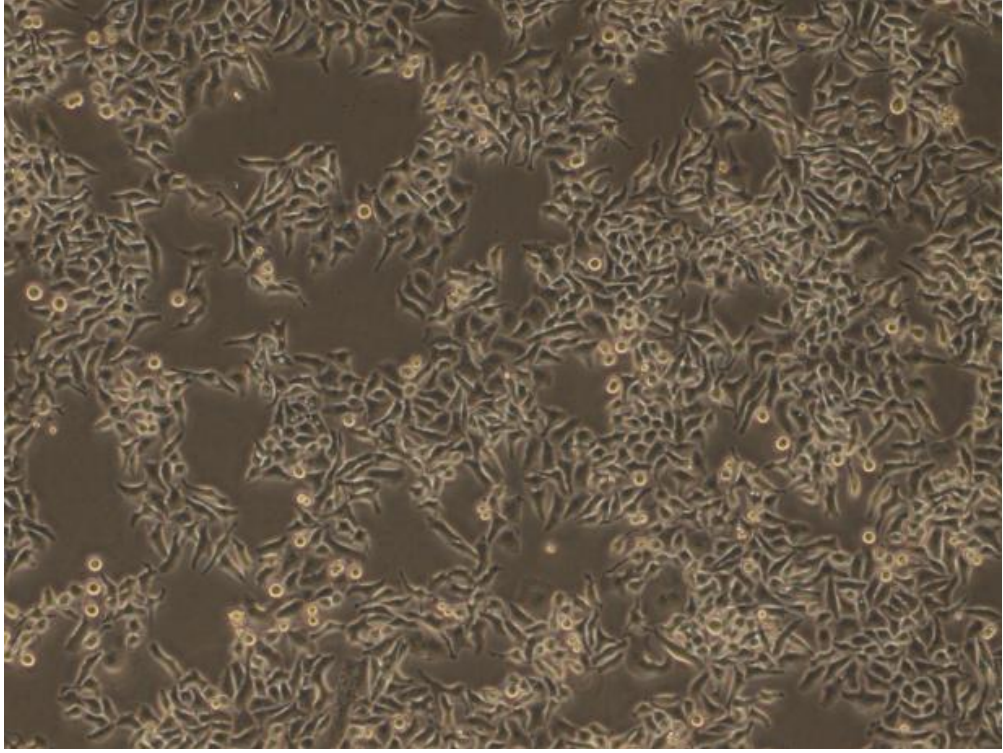
3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Eldesi

Larenks skuamöz hücreli karsinom teşhisi konulmuş ve gönüllü olarak çalışmaya katılmayı kabul ederek onam formu imzalayan 30 hasta çalışmaya dahil edildi ve İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından onaylanan Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurul Raporu alınarak çalışmalar yapıldı. Tanısı konulan bireylerden total ya da parsiyel larenjektomi sonrasında alınan skuamöz hücreli larenks kanseri tümör doku örnekleri İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edildi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda dokuların patolojik incelemesi yapılarak skuamöz hücreli karsinom oldukları doğrulandı. Ameliyat sonrası Fetal Bovin Serum (FBS) eklenmemiş ve %1 *Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin* (PSA) içeren RPMI 1640 besi yeri içerisinde alınan tümör dokularından kanser kök hücre ayrıştırması ve primer kültür işlemleri gerçekleştirildi.

3.1.2. Hep-2 Hücrelerin Temini

Hep-2 hücre hattı CD133 ve CD44 yüzey işaretçi proteinlerinin aracılığıyla hücre ayrıştırılması deneylerinde kullanılmak üzere Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Şap Enstitüsü'nden temin edildi. Epiteyal kökenli olan Hep-2 hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü Şekil 3-1' de gösterilmektedir.



Şekil 3-1: Hep-2 hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş görüntüsü ($\times 4$ ve $\times 10$)

3.1.3. Gereç ve Cihazlar

3.1.3.1. Çalışmada Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Yapılan araştırmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı' nın sahip olduğu olanaklardan faydalanıldı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Projede kullanılan gereçler ve kullanım amaçları

Adı/Modeli	Projede Kullanım Amacı
Isı döngü cihazı / Thermal Cycler – Techne	Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)
Gerçek-Zamanlı PZR / Light Cycler – Roche	Gen ekspresyonlarının ve kök hücre ayrıştırma işleminin doğrulanması
Elektroforez aletleri, güç kaynakları / Thermo	RNA kalitesinin tespiti
Laminar güvenlik kabini / Heal Force	PZR için gerekli amplifikasyon reaksiyonlarının kurulması
Derin dondurucu -20 / Vestel	Analizlerde kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması
Derin dondurucu -80 / WiseCryo	Analizlerde kullanılacak RNA örneklerinin saklanması
Kit saklama dolabı +4 / Vestel	Analizlerde kullanılacak reaktif ve solüsyonların saklanması
Spektrofotometre / NanoDrop – Thermo Sci.	Ayrıştırılan RNA örneklerinin derişimlerinin belirlenmesi
Soğutmalı Mikrosantrifüj / Hettich Rotina 420R	RNA izolasyonu
Akım Sitometre	Kök hücre ayrıştırma işlemlerinin konfirmasyonu

Otoklav	Kullanılacak malzeme ve solüsyonların sterilizasyonu
Jel dokümantasyon sistemi / Vilber Lourmat	PZR ürünlerini görüntüleme, kaydetme
Magnet	Antikor ile ayırıştırma yapma
LightCycler plate	Gerçek zamanlı PZR çalışmaları için
T25, T75 ve düşük bağlanma kapasiteli flask (BD, USA)	Hücre kültürü çalışmaları için
Polystyrene Tüp (5ml, 12×75 mm, BD, USA)	Kök hücre ayırıştırma çalışmaları için
40 ve 70 µm porlu filtre (Cell Strainer, BD Falcon, Durham, NC, ABD)	Homojen tek hücre solüsyonu elde edilmesi için
0.22 µm porlu filtre (Minisart syringe filter, Sartorius Stedim Biotech, Almanya)	Kollajenazın sterilizasyon işlemlerinde kullanılmak için
Parafilm, Soğuk Blok, Çeker Ocak, Serolojik pipet, Vortex (Wisd), Moleküler Genetik uygulamaları için gerekli diğer sarf malzemeler	

3.1.3.2. Solüsyonlar

- CD133 Antibody (CD133/1 (AC133)- PE Human, (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Almanya)
- CD44 Antibody (Anti-Human/Mouse CD44 PE, Clone:IM7, eBioscience, San Diego, Kaliforniya)
- CD34 Antibody (Anti-Human CD34 Class III PE (Gen-Probe Diaclone SAS., Fransa)
- Liyofilize kollajenaz (GIBCO Lyophilized Collagenase, 255,000 units/mg, ABD)
- Kök Hücre Ayırıştırma Kiti (EasySep Positive Selection Human PE Selection Kit, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Kanada)
 - Anti- Human CD32 (Fc gamma RII) Blocker (1ml)
 - PE (Phycoerythrin) Selection Cocktail (1ml)
 - Magnetic Nanoparticles (1ml)

- Hücre kültürü için gerekli solüsyonlar
 - RPMI 1640 besi yeri (Lonza, Verviers, Belçika)
 - Tripsin (0.05 % Trypsin/0.53 mM EDTA, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
 - Fetal Bovine Serum (FBS) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
 - Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin (PSA) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
 - L-Glutamine (L-Glu) (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
 - Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
- RNA İzolasyon Kiti (mirVana miRNA Isolation Kit, Ambion, ABD)
 - Acid Phenol: ChCl₃, 5:1 Solution)
 - Lysis/Binding Buffer (100ml)
 - miRNA Homogenate Additive (10 ml)
 - Elution Buffer
- cDNA Sentez Kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Basel Stadt, İsviçre)
- Eş Zamanlı PZR (LightCycler 480 SYBR Green I Master, Mannheim, Almanya)
- Trizolle RNA İzolasyonu
 - TRIzol (Ambion, ABD)
 - Kloroform (Sigma-Aldrich, ABD)
 - İzopropanol (Sigma-Aldrich, ABD)
 - Etanol (Merck, Darmstadt, Almanya)
- Küre Oluşturma Deneyi
 - RPMI 1640 besiyeri (Multicell, Wisent Inc., Saint-Jean-Baptiste, Kanada)
 - Epidermal Growth Factor (EGF) (0.1 mg/ml, Human Recombinant Protein, Almanya)
 - Insulin Growth Factor (IGF) (Gibco, Human Recombinant Zinc, ABD)
 - Recombinant Human Fibroblast Growth Factor- Basic (bFGF) (0.2 mg/ml, Millipore, Almanya)

3.1.3.3. Bilgisayar Programları

- BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA)
- SPSS 15.0

3.2. Yöntem

3.2.1. Hep-2 Hücre Kültürü ve Primer Hücre Kültürü Yapılması

Temin edilen Hep-2 hücreleri %1 PSA, %10 FBS ve %1 L-Glu içeren RPMI 1640 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.

Ameliyat sonrası Fetal Bovin Serum (FBS) eklenmemiş ve %1 PSA içeren RPMI besi yeri içerisinde alınan tümör dokularından kanser kök hücre ayrıştırması yapılmasıyla eş zamanlı primer kültür işlemlerine başlandı. Bunun için PBS ile yıkanan doku parçası steril petri kabı üzerinde bisturi aracılığıyla fiziksel olarak parçalandı. 10 dakika 0,4 mg/ml kollajenaz içerisinde 37°C’ de bekletilen doku parçaları %10 FBS, %1 PSA ve L-Glu içeren RPMI 1640 besi yeri içerisinde T25 flasklara ekildi. Hücre tutunması gerçekleştikten sonra 2 günde bir besiyeri değişimi sağlanarak hücreler çoğaltıldı. Primer kültürler 3. pasaja kadar pasajlanıp %10 DMSO içeren Fetal Calf Serum (FCS) solüsyonunda -80°C’ de saklanmak üzere stoklandı. Bu primer hücre hatlarından biri, kök hücre medyumunda kültür edilme işlemlerinin optimizasyon çalışmalarında kullanıldı.

3.2.2. İmmünomanyetik Yöntem ile Hep-2 Hücre Hattından ve Taze Larenks Tümör Dokularından Kanser Kök Hücrelerinin Eldesi

Çoğaltılıp stoklanan Hep-2 hücreleri çözülüp CD133 ve CD44 yüzey işaretçi proteinleri kullanılarak kanser kök hücre ayrıştırması yapıldı. CD133+, CD133-, CD44+, CD44- ve kontrol olarak kullanılan ayrıştırma yapılmamış hücreler küre oluşturma deneyi (sphere formation assay) çalışmalarında kullanıldı ve küre oluşturma kapasiteleri açısından değerlendirildi.

Hücre ayrıştırma işlemi için Fikoeritrin (PE) ayrıştırma kiti (StemCell-EasySep Positive Selection Human-PE Kit) kullanıldı. Manyetik demir nanoparçacıkların kullanıldığı bu işlemde CD133/1 (AC-133)-PE antikoru ya da CD44 (CD44-PE) kullanılarak CD133+ ve CD44+ hücrelerin ayrıştırması sağlandı. Ayrıştırma sonrasında

faz-kontrast mikroskopta yapılan incelemelerde hücrelerin tek hücre olarak elde edildiği doğrulanarak hücre ayrıştırma işleminin başarıyla gerçekleştirildiği teyit edildi. Ayrıştırma üretici firmanın protokolüne göre şu şekilde gerçekleştirildi;

CD133 ayrıştırması için 20×10^6 ve de CD44 ayrıştırması için 5×10^6 Hep-2 hücresi 250 µl Tavsiye Edilen Besi Yeri (Tablo 3-2) içerisinde çözüldükten sonra ayrıştırmada kullanılan polistren tüplere aktarıldı.

Tablo 3-2: Tavsiye Edilen Besi Yeri İçeriği

EDTA (0.5 M)	100 µl
FBS	1ml
PBS	48.9 ml
Toplam	50 ml

(Tavsiye Edilen Besi Yeri ; 1 mM EDTA ve %2 FBS içeren PBS solüsyonudur)

Hücrelerin aktarıldığı polistren tüpler için sırasıyla şu işlemler uygulandı;

25 µl Blocking antibody anti-human CD32 eklendi.

↓

15 µl Antibody (CD133/1 AC-133-Biotin) eklenip yavaşça pipetaj yapılarak oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi.

↓

25 µl EasySep PE Selection Cocktail eklendi ve pipetaj yapılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.

↓

12.5 µl EasySep Manyetik Nanoparçacıklar eklenerek hızlıca en az 5 kez olacak şekilde pipetaj yapıldı ve sonrasında pipetaj yapılmadan oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

↓

2,5 ml Tavsiye Edilen Besi Yeri eklendi ve bu karışım 2-3 defa yavaşça pipetaj yapılarak homojenize edildi. Polistren tüp magnet içine konularak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 5 dakika sonunda magnet içindeki polistren tüp magnetten ayrılmadan ters çevrilerek içindeki sıvı tek hamlede 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Böylece CD133 açısından negatif hücreler bu tüpte toplanmış oldu.

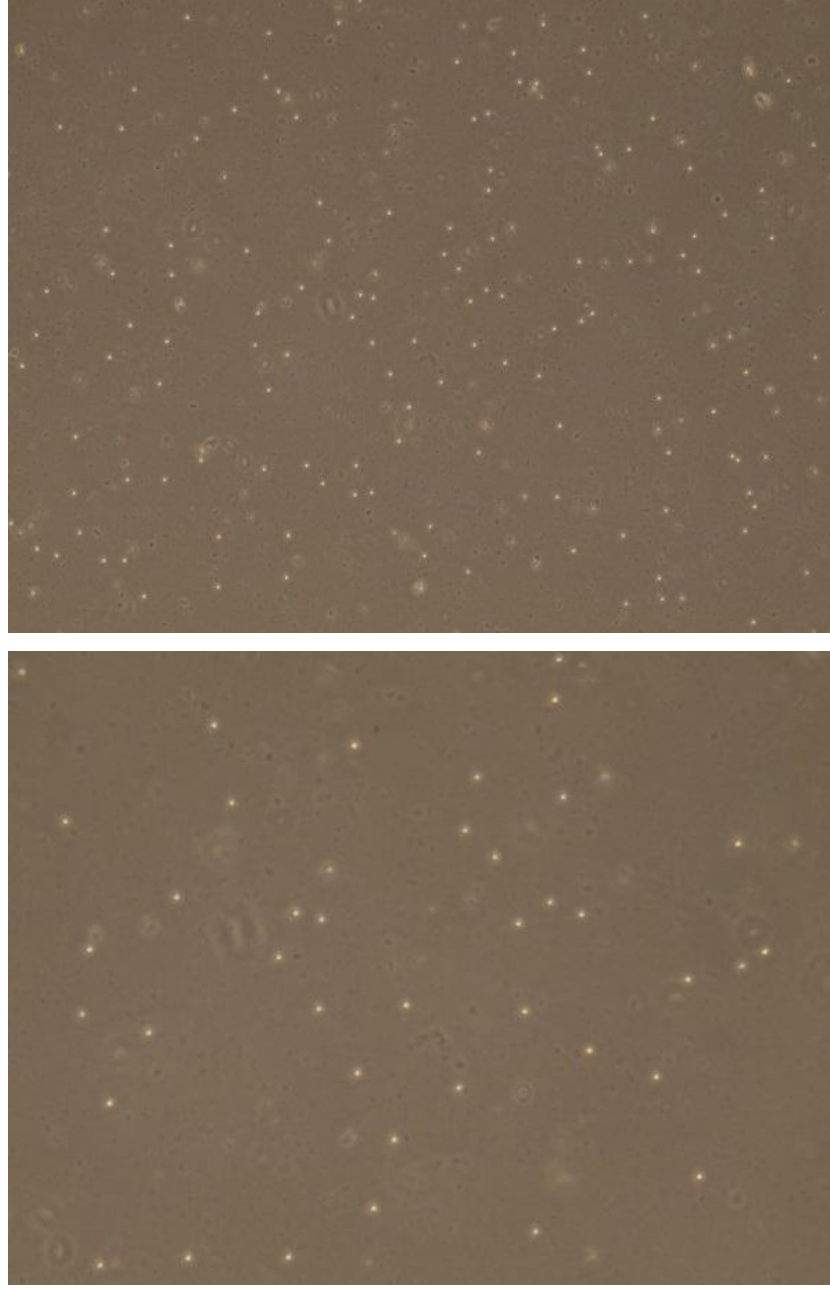
↓

Polistren tüp magnetin içinden çıkartıldı. Tüpe tekrar 2,5 ml tavsiye edilen solüsyondan eklenip tüp duvarları iyice yıkandı. Polistren tüp magnet içine yeniden konularak 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 5 dakika sonunda magnet içindeki polistren tüp magnetten ayrılmadan ters çevrilerek içindeki sıvı tek hamlede aynı 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandı. Böylece bu falkon tüpteki 7,5 ml Tavsiye Edilen Besi Yeri içinde CD133 negatif hücreler toplanmış oldu.

↓

Magnetin içindeki polistren tüp en son aşamada çıkartılarak içine 7,5 ml tavsiye edilen solüsyon eklendi ve CD133 yüzey işaretçisi bakımından pozitif hücreler bu solüsyon içerisine alındı. Elde edilen bu hücreler de ayrı bir 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Böylelikle Hep-2 hücre hattında CD133(+) ve CD133(-) hücreler elde edilmiş oldu. Falkon tüplere alınan hücreler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atılarak CD133+ ve CD133- hücre pelletleri elde edildi. Aynı işlemler CD44 antikoru için de gerçekleştirildi.

Larenjektomi sonrası FBS eklenmemiş ve %1 PSA içeren RPMI besi yeri içerisinde alınan tümör dokuları öncelikle fiziksel parçalamaya maruz bırakıldı. Bistüri ile iyice küçük parçalara ayrılan dokular 0,4 mg/ml kollajenaz + %1 PSA içeren RPMI (hazırlanan kollajenaz solüsyonu 0,22 µm porlu filtreden geçirilerek sterilize edildi) içinde 3 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda 3 saat boyunca yapılan enzimatik parçalama işleminin tek hücre solüsyonu elde etmede yeterli olmasından dolayı 3 saatlik inkübasyon tercih edildi. Enzimatik parçalama sonrasında birbirine yapışık kalmış hücreler olabileceği düşünülerek hücreler 40 µm ya da 70 µm çaplı porları olan filtrelerden (cell strainer) geçirilerek homojen tek hücre solüsyonu elde edilmesi amaçlandı ve 40 µm çaplı porları olan filtrelerin solüsyondaki hücre sayısında ciddi azalmaya sebep olduğu görüldü ve 70 µm çaplı porları olan filtrelerin kullanımının daha elverişli olduğu belirlendi. Elde edilen tek hücre solüsyonundaki hücrelere ait görüntü Şekil 3-2' de verilmektedir.



Şekil 3-2: Taze larenks tümör dokularından elde edilen tek hücre solüsyonu

Larenks tümör dokularından hücre ayrıştırma işlemleri için de Hep-2 hücreleri için kullanılan Fikoeritrin (PE) ayrıştırma kiti (StemCell-EasySep Positive Selection Human-PE Kit) kullanıldı. Üretici firmanın protokolü uygulanarak sonuçta tümör dokudaki CD133+ ve CD133- hücreler elde edilmiş oldu. Falkon tüplere alınan hücreler 1500 rpm’ de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant atılarak pellet 300 µl “Lysis Binding Solution” (mirVana miRNA İsolation Kit, Ambion, USA) eklenerek RNA izolasyonu ile devam etmek üzere -80 dereceye kaldırıldı.

3.2.3. Akım Sitometrisi Yöntemi ile Kanser Kök Hücre Ayırımının Doğrulanması

CD34 ve CD133 hücre işaretçisi kullanılarak ayrıştırılan hücrelerin verimli bir şekilde ayrıştırıldıklarını kontrol etmek için akım sitometri çalışmaları gerçekleştirildi. Ayrıştırılan hücreler %80 etanol ve %20 serumsuz besi yeri karıştırılarak oluşturulan solüsyonda +4°C’ de fikse edildi. Ardından santrifüjle çöktürölüp daha sonra PBS ile çözölerek FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) ile analiz edildi. Kontrol olarak “CD133 işaretlemesi yapılmamış hücreler” ve “ayrıştırma sonucunda CD133- olarak elde edilen hücreler” kullanıldı. Sonuçların analizi için BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA) yazılımı kullanıldı. Akım sitometrisi ile paralel olarak PZR tekniğı ile de CD133 için doğrulama yapıldı. Akım sitometrisi daha kesin bir yöntem olduğı için başlangıçta tercih edildi. PZR’a göre daha pahalı ve daha çok iş gerektiren bir teknik olduğı için ise doğrulama işlemine yalnızca PZR yöntemi ile devam edildi.

3.2.4. Hep-2 Hücrelerinden ve Primer Kültür Hücrelerinden Küre Oluşturma Deneyi (Sphere Formation Assay) Yapılması

Hep-2 hücrelerinden immünomanyetik ayrıştırma sonrası elde edilen CD133+, CD133-, CD44+, CD44- hücreler ve ayrıştırma yapılmamış hücreler, ayrıca oluşturulan primer kültür hücre hatları kök hücre medyumunda büyütölerek kök hücre zenginleştirmesi yapılması amaçlandı. Kök hücre medyumunu olarak FBS içermeyen ve bFGF (basic fibroblast growth factor, 20 ng/mL), EGF (epidermal growth factor, 20 ng/mL) ve insulin (5 µg/mL) büyüme faktörleri eklenmiş RPMI 1640 besi yeri hazırlandı. Kök hücre kültürü yapılırken hücrelerin flask yüzeyine minimum düzeyde tutunmaları gerekmektedir. Hücrelerin yüzeye tutunamadıkları ortamda “küre” oluşturarak kök hücre zenginleşmesine yol açtığı bilinmektedir. Bu sebeple hücreler kök hücre medyumunu olarak hazırlanan besiyerinde çözölerek düşük bağlanma kapasiteli (Low attachment) 96 kuyucuklu plate’lere kuyucuk başına 500 hücre gelecek şekilde 2 tekrarlı olarak ekildi ve %5 CO2 ile 37°C koşullarında kültür edildi. Küre oluşumu için 3 günde bir pasajlama yapıldı (135). 10 gün sonunda her örnek için 10x büyütmede 3 farklı bölgeden küre sayımı yapıldı. Çapı 50 µm’ den büyük olan küreler sayıldı. Bu işlem sonrasında hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı ve normal besi yerinde büyütölün hücreler kontrol olarak kullanılarak kök hücre işaretçisi genlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

3.2.5. Primer Kültürü Yapılan Hücrelerden TRIzol RNA İzolasyonu

Hücreler kültür edildikleri besi yerleri uzaklaştırılıp sonrasında Tripsin içerisinde 37°C’ de 5 dakika inkübe edilerek tutundukları T75 flask yüzeyinden kaldırıldı. 1500 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülen hücreler sonrasında PBS ile yıkanarak RNA izolasyonu için hazır hale getirildi. Hücrelerden RNA izolasyonu TRIzol kitiyle üretici firmanın protokolüne göre yapıldı.

Primer kültür hücreleri santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet 1 ml TRIzol solüsyonu ile muamele edildi. TRIzol içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek hücrelerin iyice parçalanması ve nükleik asitlere bağlanan proteinlerin nükleik asitlerden ayrışması sağlandı. Sonrasında 200 µl kloroform eklenerek örnek iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletildikten sonra 4°C’de 12.000xg’de 15 dakika santrifüjlendi. Faz ayrışması gerçekleşen solüsyonun üstteki (aqueous phase) RNA içeren organik fazı yeni mikrosantrifüj tüpe aktarıldı. Ardından 500 µl izopropanol eklenerek iyice karıştırılan örnek 15-30°C’ de 10 dakika bekletildikten sonra 4°C’de 12.000xg 10 dakika santrifüjlendi. Bu adım sonrasında beyaz renkte ya da renksiz çökelti şeklinde görülebilen RNA %75 etanol ile yıkanarak 4°C’de 7.500xg’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Son olarak kurumaya bırakılan RNA iyice kuruduktan sonra nükleaz içermeyen steril su içerisinde çözüldü. RNA konsantrasyon ve saflıkları spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

3.2.6. CD133+ ve CD133- Hücrelerden RNA İzolasyonu

Çok az miktarda hücreyle bile kaliteli ve yeterli konsantrasyonda ürün veren “miRVana miRNA İzolasyon Kiti” (Ambion, Darmstadt, Germany) ile RNA izolasyonu yapıldı. Üretici firmanın protokolüne göre sırasıyla şu işlemler uygulandı;

Lysis Binding Solution eklenerek -80°C’ ye kaldırılan hücreler vortekslenerek üzerine 30 µl ‘miRNA Homogenate Additive’ eklendi ve tekrar vortekslendikten sonra 10 dakika buz üzerinde bekletildi. 300 µl asit fenol kloroform eklenerek 30-60 saniye vortekslendi. Ardından oda sıcaklığında maksimum hızda (10.000xg), 5 dakika santrifüj yapılırca faz ayrımı gerçekleşti. Üstteki şeffaf faz RNA’ yı, ara faz yüksek moleküler ağırlıklı DNA’ yı, alttaki faz ise ekstrasellüler membranı ve polisakkaritleri içermektedir. Bu yüzden RNA’yı içeren üstteki faz steril ependorf tüpe aktarıldı. Elde edilen üst fazın miktarının 1.25 katı kadar %100 etanol (oda sıcaklığında bulunan) eklenerek karışım kolonlu tüpe aktarıldı. 15 saniye 10.000xg’ de santrifüj yapıldıktan

sonra yıkama işlemine geçildi. Bunun için sırasıyla önce 700 µl “mirVana Wash Solution 1” eklenerek 5-10 saniye santrifüj yapılarak alttaki toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı. Daha sonra kolona 500 µl “mirVana Wash Solution 2-3” ilave edilerek 5-10 saniye santrifüjün ardından tekrar toplama tüpüne geçen sıvı dökülerek “500 µl Wash Solution 2-3” ile aynı işlem tekrarlandı. Son olarak filtreli tüp içine herhangi bir solüsyon koyulmaksızın boş olarak santrifüj edildi. Temiz toplama tüpü üzerine alınan filtreye önceden 95°C sıcaklığa getirilen 30 µl elution buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletildikten sonra 30 saniye maksimum hızda santrifüjlenerek total RNA eldesi gerçekleştirildi. RNA’lar kullanılacakları zamana kadar -80°C’ de saklandı.

3.2.7. RNA Derişimlerinin Ölçülmesi

İzole edilen RNA örneklerinin NanoDrop ND-2000c (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE) spektrofotometre ile absorbans değerleri ölçüldü. Spektrofotometre ile ölçülen 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri kullanılarak, RNA örneklerinin derişimlerinin ve saflık derecelerinin hesaplanması, karşılaştırılması ve sonuçların deneysel uygulama aşamaları açısından değerlendirilmesi gerekmektedir.

RNA derişimi; absorbans değerinin, DNA katsayısı ve sulandırma katsayısıyla çarpılmasıyla hesaplandı. Formüle etmek gerekirse;

$$\text{RNA derişimi } (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme katsayısı} \times 40 \mu\text{g/ml}) / 1000$$

Absorbans değerinin “1” oluşu 1 cm³ lük küvette 50 µg/ml miktarında çift zincirli DNA’ yı, 33 µg/ml tek zincirli oligonükleotidler ve 40 µg/ml ise tek zincirli RNA’ yı temsil etmektedir. Bunun yanı sıra örneklerin saflığı, spektrometrede 260 nm ve 280 nm ile yapılan ölçümlerin karşılaştırılmasıyla elde edildi. 260/280 oranı, örneklerin saflığını belirtmektedir ve RNA için en ideal değer 2’ dir.

3.2.8. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

25 adet CD133+ ve CD133- hücre çiftinden 12 çiftin RNA konsantrasyonları cDNA sentezi için yeterli bulundu. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Version 6.0, Roche, Almanya) kullanılarak total 200 ng RNA’dan kantitatif RT-PZR için standart prosedür uygulanarak Random Hexamer ve Oligo dT primerler ile cDNA sentezi yapıldı. Primer kültürlerden oluşturulan kürelerden elde edilen RNA’ lardan ise

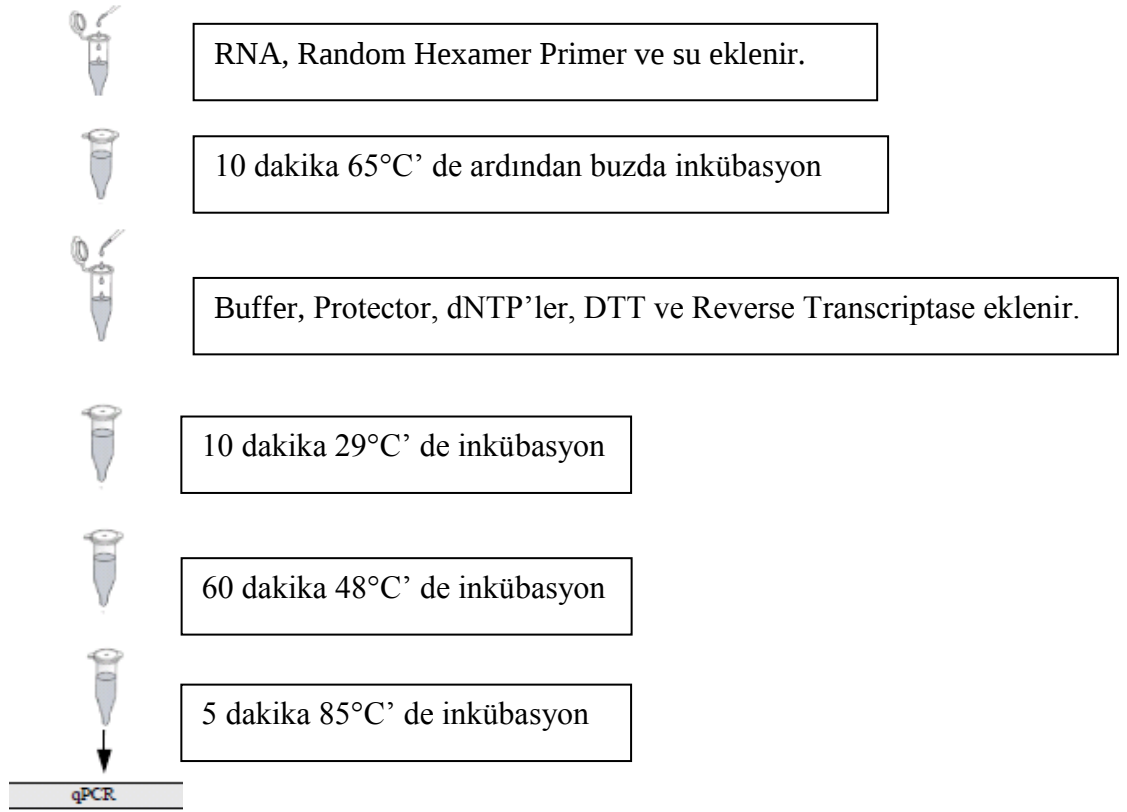
total 1000 ng kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Tüm reaktifler sentez işlemleri sırasında buzda bekletildi. Ependorf tüp içerisinde total RNA, Random Hexamer ve Oligo dT primerler ve nükleaz içermeyen su tabloda belirtilen oranlarda karıştırıldı (Tablo 3-3). Bu karışım 10 dakika 65°C’ de inkübe edilerek RNA molekülünün ikincil katlanmalarının açılması gerçekleştirildi. Ardından tüp hemen buza alındı.

Tablo 3-3: Reaktifler ve cDNA sentezi için gerekli miktarlar

Reaktifler	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	0,2 µg
Anchored-oligo(dT) Primer	1	2,5 mM
Random Hexamer Primer	1	2,5 mM
PZR için nükleazsız su	Değişken	Toplam hacim 11,4 µl' ye tamamlanır
Transcriptor RT Reaction buffer, 5x	4	1x(8mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5	20 U
dNTP Mix 10mM	2	1mM
DTT	1	5 mM
Transcriptor Reverse Transcriptase	1,1	10 U
Total	20	

RNA, primer ve su içeren karışıma Tablo 3-3’ teki diğer reaktiflerle karışım hazırlanarak ilave edildi. Elde edilen bu son karışım ısıtıcı blok üzerinde 10 dakika 29°C’ de ve ardından da 60 dakika 48°C’ de inkübasyona bırakıldı.

Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase enziminin aktivitesini durdurmak için karışım 5 dakika 85°C’ de inkübe edildi. Ardından tüpler buza alınarak reaksiyon sonlandırıldı (Şekil 3-3). Gen ekspresyon çalışmaları yapılınca kadar üretilen cDNA’ lar -20°C’ de bekletildi.



Şekil 3-3: cDNA sentezi

3.2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) ile Kök Hücre İşaretçilerinin İfade Düzeylerinin Araştırılması

Primer kültürlerden oluşturulan kürelerden ve kontrol grubu hücrelerinden, ayrıca taze larenks tümör dokusundan ayrıştırılan CD133+ ve CD133- RNA örneklerinden hazırlanan cDNA' lar, hedef gen ekspresyon seviyesi analizi için yapılan qRT-PZR' de kullanıldı. Bu reaksiyon SYBR Green metodu kullanılarak 2 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. qRT-PZR karışımı ve PZR sıcaklık koşulları Tablo 3-4 ve 3-5' te verilmektedir.

Tablo 3-4: qRT-PZR reaktifleri

İçerik	Hacim (µL) / reaksiyon
SYBR Green Master Mix	5
Nükleazsız su	2,5
RT Primer prob F ve R	0,5
cDNA örneği	2
Total	10

Tablo 3-5: qRT-PZR sıcaklık koşulları

95°C' de 5 dakika	
95°C' de 10 saniye 60°C' de 15 saniye 72°C' de 25 saniye	×40
40°C' de 30 saniye	

Primer kültürlerden oluşturulan küreler ile kontrol grubu olarak normal besi yerinde büyütülen hücrelerde OCT4 ve KLF4 genlerinin ifade düzeyleri rölatif kantitasyon yöntemi kullanılarak incelendi. Taze larenks dokusundan ayrıştırılan hücrelerde ise CD133, CXCR4, KLF4, ABCG2, OCT4, SOX2 ve CD44 genlerinin ifade düzeyleri rölatif kantitasyon yöntemi kullanılarak incelendi. İnternal kontrol olarak β -aktin geni kullanıldı. Optimizasyon çalışmaları bütün primerler için optimum bağlanma (annealing) sıcaklığının 60°C olduğunu gösterdi. Kanser kök hücre karakterizasyonunda kök hücrelere özgü genlerin ifade düzeylerinin analizi için Tablo 3-6' da verilen primer çiftleri kullanıldı.

Tablo 3-6: qRT-PZR çalışmalarında kullanılan primer çiftleri

	Primer Liste	Baz Sayısı	Referans
Beta-actin-F	5'-GCCTCGCCTTTGCCGATC-3'	18	*
Beta-actin-R	5'-CCCACGATGGAGGGGAAG-3'	18	*
CD133-F	5'-CGGCACCATTGGTCTCTGG-3'	19	*
CD133-R	5'-CAGCACACTCCACACATGGC-3'	20	*
CXCR4-F	5'-CCCTCAAGACCACAGTCATCC-3'	21	*
CXCR4-R	5'-TTCTCAAACCTCACACCCTTGC3'	21	*
KLF4-F	5'-CCCAATTACCCATCCTTCCTG-3'	21	*
KLF4-R	5'-GTCTTCCCCTCTTTGGCTTG-3'	20	*
OCT4-F	5'-CTGGAGAAGGAGAAGCTGGA-3'	20	(177)
OCT4-R	5'-CAAATTGCTCGAGTTCTTTCTG3'	22	(177)
Sox2-F	5'-CTCCGGGACATGATCAGC-3'	18	(178)
Sox2-R	5'-GGTAGTGCTGGGACATGTGAA3'	21	(178)
ABCG2-F	5'-AGCAGCAGGTCAGAGTGTGG-3'	20	*
ABCG2-R	5'-GATCGATGCCCTGCTTTACC-3'	20	*
CD44-F	5'-ACTGCAGCCAACTCCGAGG-3'	20	*
CD44-R	5'-GGAATACACCTGCAAAGCGG-3'	20	*

* Ensemble, Primer 3, Primer Blast, SNP Check, UCSC *in silico* PCR İnternet programları kullanılarak tasarlanan primerleri ifade etmektedir.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

RT- PZR için normalizasyonda β -aktin geni kullanıldı. Hedef gen ekspresyon seviyesi analizleri yapılan genler ΔCt değerleri hesaplanarak rölatif kantitasyon yöntemleri kullanılarak incelendi. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi ve istatistiksel analizler Student's t test kullanılarak yapıldı. Her bir genin ekspresyonunun CD133 ekspresyonu ile korelasyonu Pearson korelasyon testi kullanılarak analiz edildi. Bunun yanı sıra test edilen tüm genlerin ekspresyonunun CD133 ekspresyonu ile korelasyonu Kruskal Wallis testi kullanılarak da değerlendirildi. 'p' değeri 0,05' ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Matrix2png arayüzü kullanılarak test edilen genler için cluster (küme) histogramı hazırlandı (179).

4. BULGULAR

4.1. Hasta Bilgileri

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edilen 30 adet Larenks Kanseri tümör örneklerinin skuamöz hücreli karsinom olduklarına dair patolojik incelemeler İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü tarafından yapılarak doğrulanmıştır. Elde edilen tümör dokularının patoloji inceleme sonuçları ve hastalarla ilgili bilgiler aşağıda Tablo 4-1' de verilmektedir. 29 erkek ve 1 kadın hastadan sağlanan tümör dokularından 20 adeti total larenjektomi ile ve 8 adeti parsiyel larenjektomi ile elde edilirken 2 adeti ise biyopsi olarak alınmıştır. Patolojik incelemeler sonucunda histolojik grade, 20 hastada III, 10 hastada II tespit edilmiştir. 7 hastada nekroz görülmemiştir, nekroz görülen hastalarda ise %5-40 arasında hastadan hastaya değişken oranda nekroz mevcuttur. Tümör yerleşimleri ağırlıklı olarak supraglottik bölge tespit edilmiş olan bu hasta grubunda yaş ortalaması $61,5 \pm 2,1$ bulunmuştur. Hasta bilgileri Tablo 4-2' de özetlenmiştir.

Tablo 4-1: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler

Örnek adı	Yaşı / Cinsiyeti	Ameliyat Türü	Tümör Çapı (cm)	TNM Evrelemesi	Histolojik Grade	Patolojik Tanı	Nekroz
C1	56 / E	Total Larenjektomi	4,2x3x2,3	T3N0	III	Sol glotik + supraglotik bölge yerleşimli	%10
C2	67 / E	Parsiyel Larenjektomi	2x1,6x0,8	T2N0	III	Sağ frontolateral bölge yerleşimli	Görülmedi
C3	61 / E	Parsiyel Larenjektomi	3,5	T2N0	III	Sağ supraglotik bölge yerleşimli	%10
C4	75 / E	Total Larenjektomi	3,5	T4N1	III	Supraglotik bölge yerleşimli	%10
C5	64 / E	Total Larenjektomi	3,5x1,5x1,5	T3N2B	III	Epiglotik kök ve supraglotik bölge yerleşimli	%10-20
C6	62 / E	Total Larenjektomi	5x3,5x2	T3N0	III	Epiglotik kök ve supraglotik bölge yerleşimli	%10>
C7	63 / E	Total Larenjektomi	5x3,5x1,5	T4N2B	III	Sağ piriform sinüs bölge yerleşimli	%30
C8	49 / E	Total Larenjektomi	4	T4N2C	III	Supraglottik bölge yerleşimli	%40
C9	60 / E	Total Larenjektomi	2,6	T3N0	II	Sağ glottik bölge yerleşimli	%5
C10	65 / E	Total Larenjektomi	7	T4N0	III	Transglottik bölge yerleşimli	%20
C11	53 / E	Parsiyel Larenjektomi	1	T1N0	II	Sağ frontolateral bölge yerleşimli	<%20
C12	72 / E	Total Larenjektomi	2x1,4x0,8	T3N0	II	Posterior krikoid bölge yerleşimli	Görülmedi
C13	45 / E	Parsiyel Larenjektomi	4x3,5x1,8	T1N0	III	Supraglottik bölge yerleşimli	Görülmedi

C14	64 / E	Parsiyel Larenjektomi (Epiglottektomi)	2,7x2x1,9	T1N2	III	Supraglottik bölge yerleşimli	%30
C15	53 / E	Parsiyel Larenjektomi	2x2x0,4	T1N0	II	Frontoanterior bölge yerleşimli	Görülmedi
C16	61 / E	Total Larenjektomi	4x4x3	T4N0M0	II	Sağ glottik bölge yerleşimli	%20
C17	54 / E	Total Larenjektomi	4x3x1,2	T4N0	III	Sağ glottik bölge yerleşimli	Görülmedi
C18	54 / E	Parsiyel Larenjektomi	5x4x1	T2N3	III	Supraglottik bölge yerleşimli	%15
C19	66 / E	Total Larenjektomi	1,8x1,5x0,6	T4N0	III	Sağ glottik ve supraglottik bölge yerleşimli	Görülmedi
C20	69 / E	Total Larenjektomi	3x1,5x0,7	T4N0	II	Bilateral glottik ve supraglottik bölge yerleşimli	Görülmedi
C21	64 / E	Biopsi	3x2,5x1,7	T4N1	III	Peristomal bölge yerleşimli	%30
C22	72 / E	Total Larenjektomi	3,5x3x1,5	T1N0	III	Supraglottik bölge yerleşimli	%10
C23	66 / E	Total Larenjektomi	3x2,5x1,7	T3N2	II	Sağ radikal boyun bölge yerleşimli	%30
C24	44 / K	Total Larenjektomi	5x5x1,5	T3N1	III	Sağ-sol supraglottik bölge yerleşimli	%30
C25	48 / E	Total Larenjektomi	2,5	T4N1	II	Sağ-sol supraglottik bölge yerleşimli	%20
C26	44 / E	Parsiyel Larenjektomi	5x4,4x1	T4N2B	III	Sağ supraglottik bölge yerleşimli	%10
C27	73 / E	Total Larenjektomi	3x3x2	T4N1B	III	Bilateral supraglottik bölge yerleşimli	%10
C28	84 / E	Total Larenjektomi	3,5x3,5x2,5	T4N0	II	Sağ glottik bölge yerleşimli	Mevcut
C29	69 / E	Total Larenjektomi	4x3x2	T4N1A	III	Sağ supraglottik bölge piriform sinüs yerleşimli	%20
C30	68 / E	Biopsi	3,5x3x2	T3N1B	II	Aryepiglottik sol biyopsi materyali	%30

Tablo 4-2 devamı: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'ndan temin edilen Larenks Kanseri tümör örneklerine ve hastalara ait bilgiler

Tablo 4-3: 30 skuamöz hücreli larenks kanserli hastanın klinik ve patolojik özellikleri

Larenks Skuamöz Hücreli Karsinom	
Toplam hasta sayısı: 30	
Yaş	
≤ 60	11
> 60	19
Cinsiyet	
Erkek	29
Kadın	1
Sigara kullanımı	
Var	25
Yok	5
Alkol kullanımı	
Var	6
Yok	24
Tümör yerleşimi	
Supraglottik	17
Subglottik	-
Glottik	4
Transglottik	1
Diğer	8
T evresi	
T1 ve T2	8
T3 ve T4	22
Histolojik grade	
1	-
2	10
3	20
Tümör boyutu	
≤ 2 cm ³	5
> 2 cm ³	25

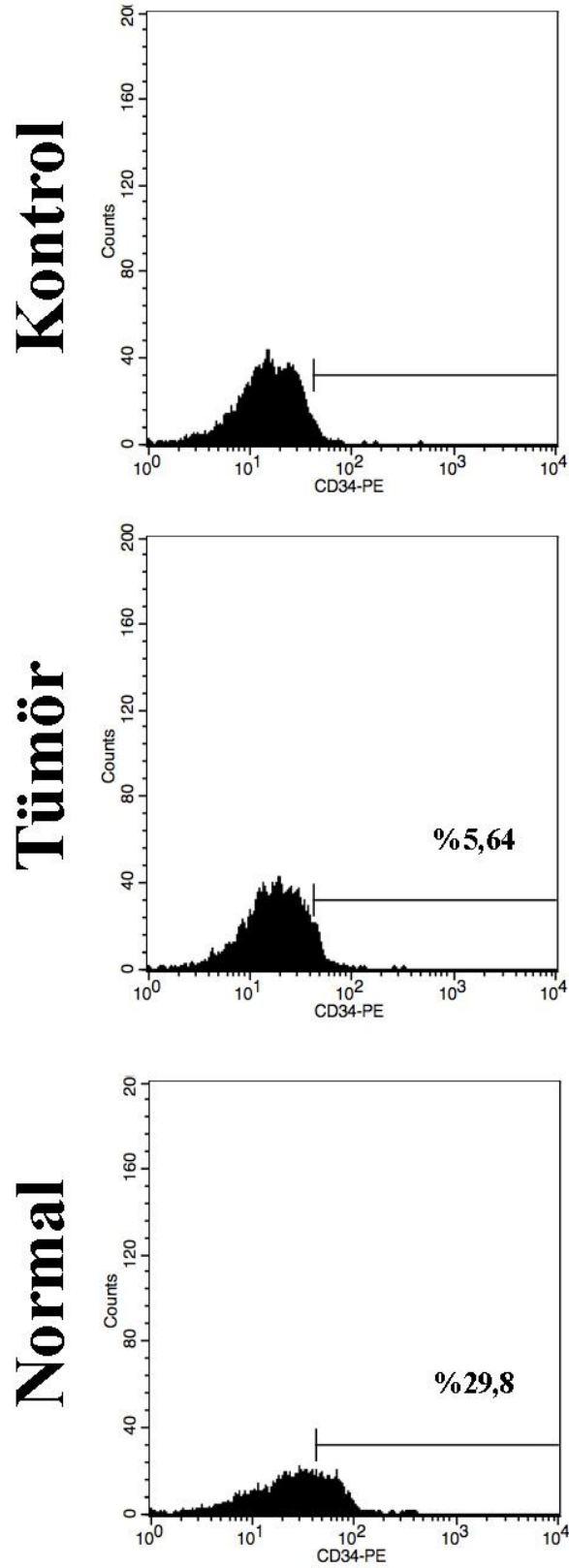
CD133+ ve CD133- hücrelerden miRVana kiti kullanılarak yapılan izolasyon sonucu elde edilen toplam 50 adet RNA' ya ait konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4-3' te verilmiştir. 5 hastaya ait tümör dokusundan 1'i CD34 ile akım sitometri çalışmalarında, 2' si CD133 ile akım sitometri çalışmalarında ve 2' si de hücre ayırıştırma optimizasyon çalışmalarında kullanıldığından bunlara ait RNA örnekleri bulunmamaktadır.

Tablo 4-4: CD133+ ve – hücrelere ait RNA konsantrasyon ve saflıkları

Örnek adı	#	CD133- (ng/μl)	A(260/280)	#	CD133+ (ng/μl)	A(260/280)
C2	1	52,7	2,06	2	15,7	2,1
C3	3	4,1	2,07	4	8	2,08
C4	5	93	1,91	6	75,1	1,92
C5	7	49,8	1,5	8	12,8	1,56
C6	9	7,5	2,16	10	4,4	2,09
C7	11	5,4	1,98	12	35	2,03
C8	13	843,3	1,99	14	35,4	1,79
C9	15	37,4	2,1	16	30,3	1,73
C12	17	90,6	1,91	18	3,9	1,92
C13	19	230,8	1,96	20	5	2,25
C14	21	268,7	2,03	22	6,4	2,28
C15	23	181,3	2	24	8,6	1,83
C16	25	291,7	2,02	26	91,1	1,9
C17	27	215,7	1,91	28	40,4	1,94
C18	29	285,8	1,94	30	1,2	2,84
C20	31	24,5	2,01	32	2,6	2,22
C21	33	112,7	1,99	34	32,2	2,1
C22	35	108,6	1,95	36	7	1,77
C23	37	16,6	1,72	38	10,5	1,59
C24	39	659,2	2,08	40	279,8	1,94
C26	41	219,3	2,06	42	25,5	1,96
C27	43	100,9	2,04	44	11	1,89
C28	45	133	1,94	46	24,9	1,86
C29	47	117,3	1,97	48	38,6	1,55
C30	49	478,5	1,96	50	27,5	1,73

4.2. Larenks Tümör ve Normal Dokulardan Elde Edilen Hücrelerin CD34 Yüzey İşaretçisi Açısından Değerlendirilmesi

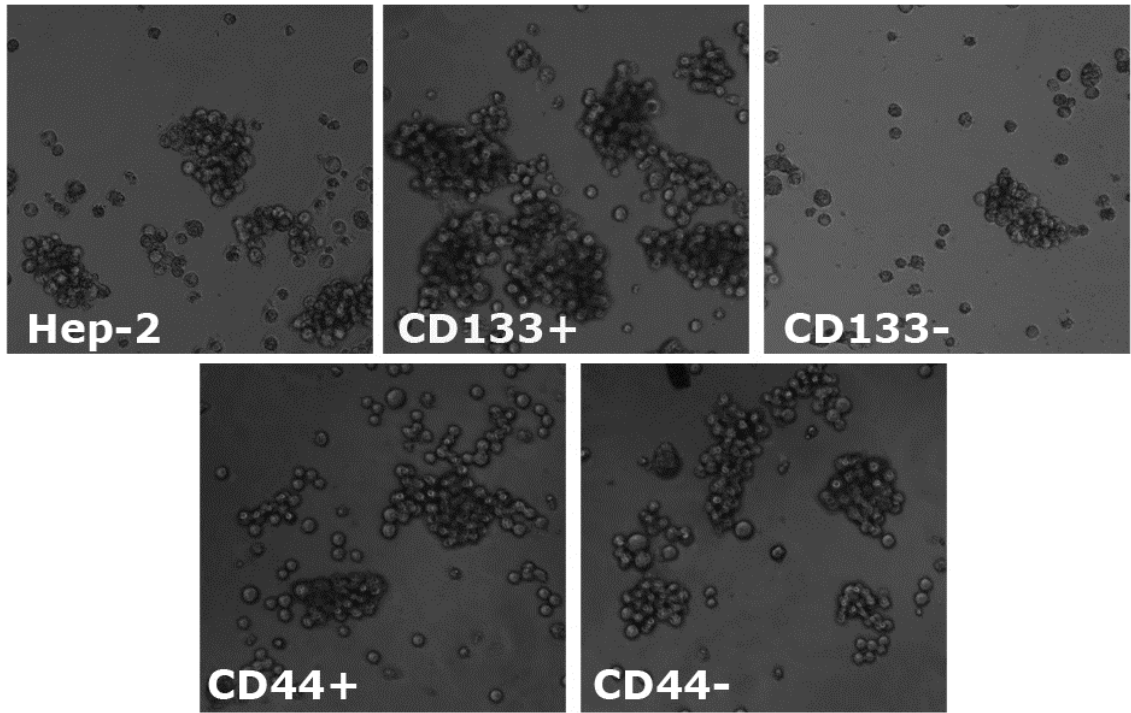
Kanser kök hücrelerinin CD34 yüzey proteini taşımadıklarını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (180, 181). Hücrelerin bu özelliklerinden faydalanarak negatif ayırma yöntemiyle CD34 taşımayan hücrelerin diğerlerinden ayrılması mümkündür. Bunun için öncelikle tek hücre haline getirilmiş tümör ve normal doku örnekleri CD34 ile işaretlenerek hücrelerin CD34 yüzey işaretçisi açısından pozitif olup olmadıkları araştırıldı. Elde edilen sonuçlar CD34 ile boyanmamış kontrol hücrelerle (%1,9) karşılaştırıldığında tümör dokusundan elde edilen hücrelerin çok az bir bölümünün (%5,64) CD34 açısından pozitif oldukları tespit edildi. Tümör dokusuna yakın bölgeden alınan normal dokuda ise CD34+ hücrelerin oranının %29,8 olarak bulunmuştur. Tümör dokusunda CD34+ hücrelerin çok küçük bir popülasyon oluşturdukları görüldüğü için CD34 yüzey işaretçisi kullanılarak negatif ayırıştırma yöntemi yardımıyla kök hücre ayırıştırması yapılmasına gerek olmadığına karar verildi. CD34 işaretlemesi sonrasında hem tümör hücreleri hem de normal hücrelerle yapılan akım sitometri analizi sonuçları Şekil 4-1' de verilmiştir.



Şekil 4-1: Manyetik hücre ayrıştırması sonrasında CD34 ile boyanmamış kontrol hücreleri, CD34 ile boyanmış tümör doku hücreleri ve CD34 ile boyanmış normal doku hücrelerinde CD34 işaretçisi için yapılan akım sitometri analizi

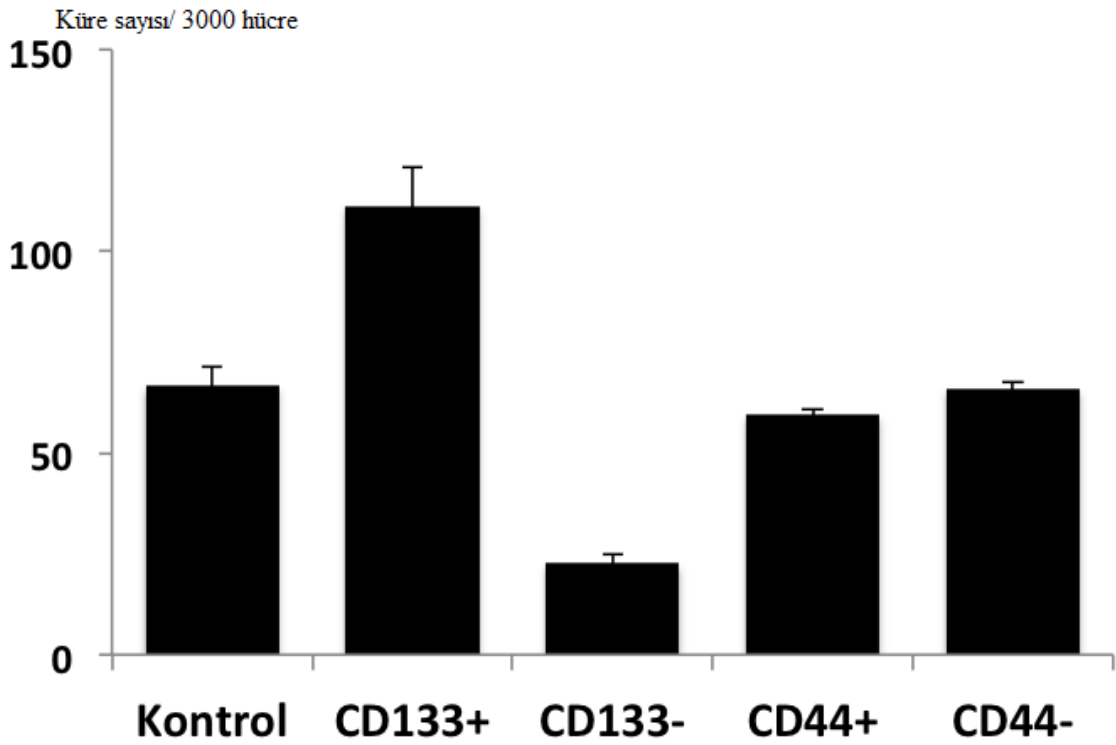
4.3. Hep-2 Hücrelerinde CD133 ya da CD44 Yüzey İşaretçileri ile Ayırıştırılan Hücrelerin Kök Hücre Potansiyellerinin Küre Oluşturma Deneyi İle Karşılaştırılması

Stoklanan Hep-2 hücreleri çözülüp CD133 ve CD44 yüzey işaretçi proteinleri kullanılarak kanser kök hücre ayırıştırması (StemCell-EasySep Positive Selection Human-PE Kit) yapıldı. CD133+, CD133-, CD44+, CD44- ve kontrol olarak kullanılan ayırıştırma yapılmamış Hep-2 hücreleri FBS içermeyen ve bFGF, EGF ve insulin büyüme faktörleri eklenmiş RPMI 1640 besi yeri koşullarında küre oluşturma deneyi çalışmalarında kullanıldı ve küre oluşturma kapasiteleri açısından değerlendirildi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: CD133+, CD133-, CD44+, CD44- ve ayırıştırma yapılmamış Hep-2 hücreleri ile yapılan küre oluşturma deneyi (×10)

96 kuyucuklu platelere kuyucuk başına 3.000 hücre düşecek şekilde ekilen ayrıştırma yapılmamış hücrelerin ortalama $66,6 \pm 4,9$ küre oluşturduğu görüldü. CD133+ hücrelerin ise kuyucuk başına $111,3 \pm 9,4$ küre oluşturduğu bunun da kontrol hücrelere göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0,01$). CD133- hücreler ise $22,6 \pm 2,06$ küre oluşturdu. Bu da kontrol hücrelerin oluşturduğu küre sayısının neredeyse 1/3' üne denk gelmektedir ($p=0,001$). Diğer yandan CD44 ile ayrıştırılan hücrelerden ne CD44+ ne de CD44- hücrelerin oluşturduğu küre sayısında kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4-3)



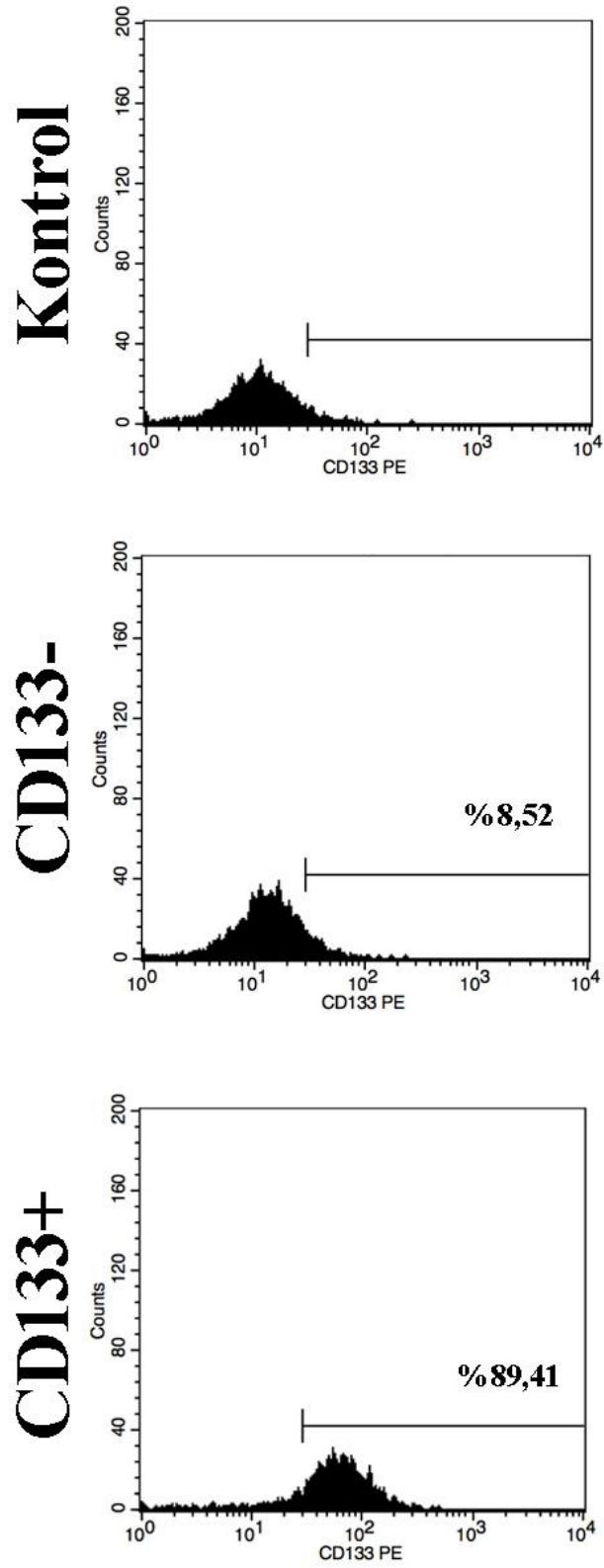
Şekil 4-3: CD133+ Hep-2, CD133- Hep-2, CD44+ Hep-2, CD44- Hep-2 ve ayrıştırma yapılmamış Hep-2 hücreleri (kontrol) ile yapılan küre oluşturma potansiyellerinin karşılaştırılması

4.4. İmmünomanyetik Yöntem ile Taze Larenks Tümör Dokularından Kanser Kök Hücrelerinin Eldesi

Literatürdeki önceki çalışmalarda kanser kök hücrelerinde mevcut olduğu belirtilen CD44+, CD133+ ve CD34- fenotiplerine ilişkin bu tez projesi kapsamında yapılan denemelerde elde ettiğimiz veriler göz önüne alındığında kök hücre ayrıştırması işlemlerine CD133 ile devam edilmesine karar verildi.

4.5. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayrıştırılan Hücrelerin Akım Sitometri Yöntemi ile Kanser Kök Hücre Ayrımının Doğrulanması

CD133 hücre işaretçisi kullanılarak ayrıştırılan hücrelerin verimli bir şekilde ayrıştırıldıklarını kontrol etmek için akım sitometri çalışmaları gerçekleştirildi. Kontrol olarak “CD133 işaretlemesi yapılmamış hücreler” ve “ayrıştırma sonucunda CD133- olarak elde edilen hücreler” kullanıldı. Sonuçların analizi için BD CellQuest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA) kullanıldı. Sonuç olarak %89,41’i CD133+ hücrelerden oluşan hücre süspansiyonu elde edildiği gözlemlendi. Bu sonuç literatürde aynı yöntemle beyin tümör dokusundan CD133 hücre ayrıştırılması yapılan makalede verilen pürite sınırlarının (%70-91) üst seviyesinde yer almaktadır (127). Elde edilen sonuçlar Şekil 4-4’ te gösterilmektedir.

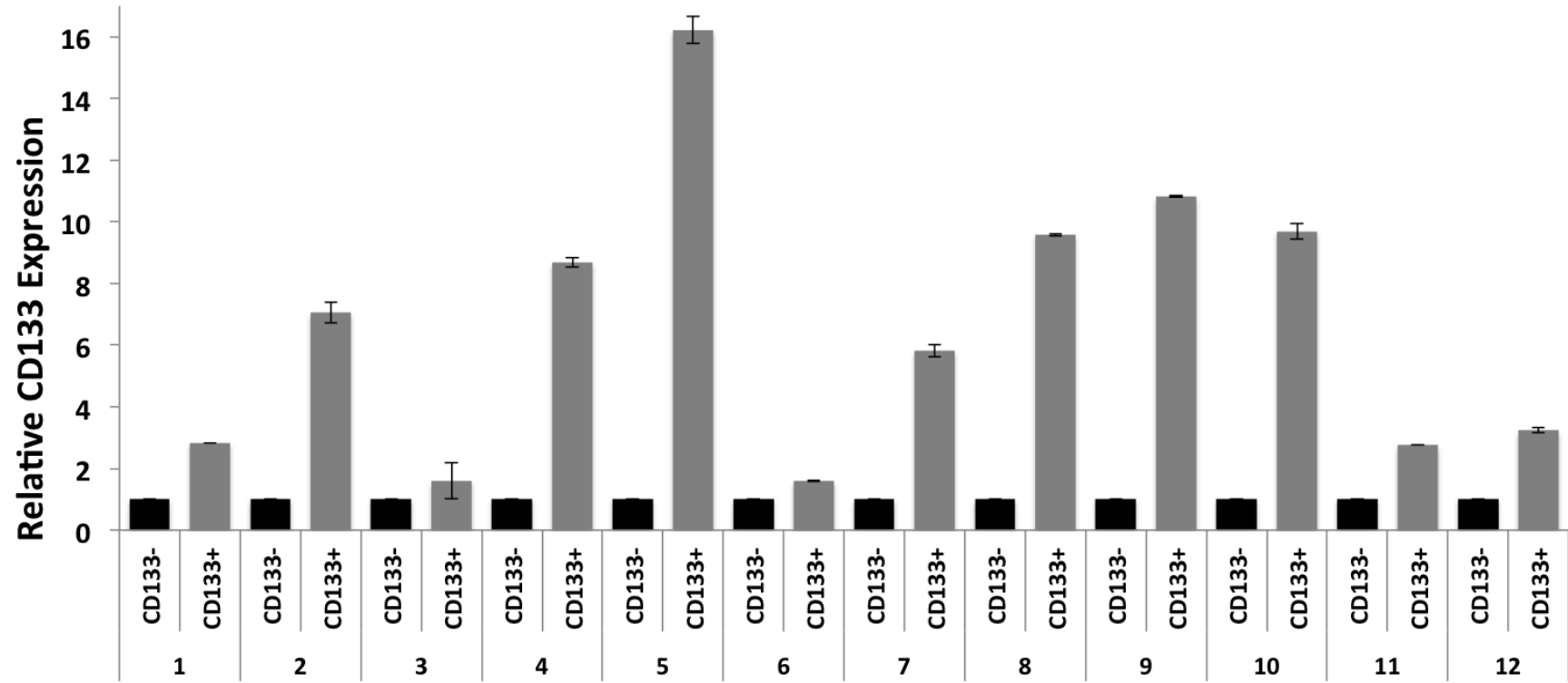


Şekil 4-4: Manyetik hücre ayrıştırması sonrasında CD133 ile boyanmamış kontrol hücreleri, CD133 işaretlemesi yapılan CD133- ve CD133+ hücrelerde CD133 işaretçisi için yapılan akım sitometri analizi

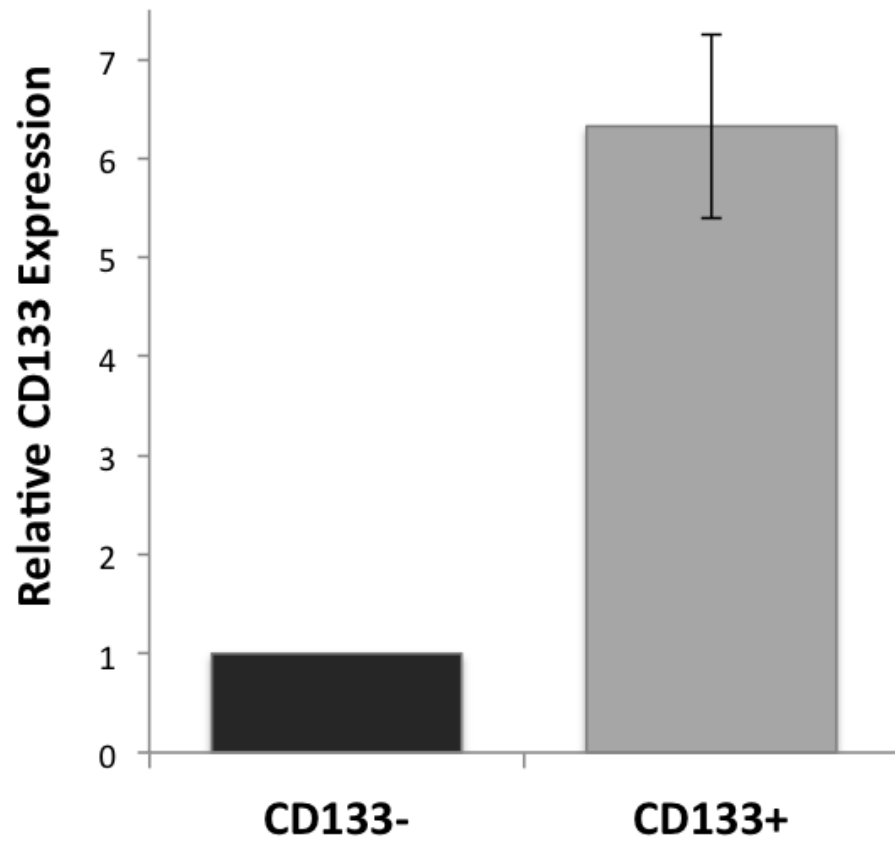
4.6. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayırıştırılan Hücrelerin CD133+ Olduklarının qRT-PZR ile Gen İfade Analizleri Yapılarak Doğrulanması

Gerçek zamanlı PZR deneylerinde, ayırıştırılan hücrelerin CD133 pozitifliği açısından doğrulanması için CD133 primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı ve kontrol olarak hücrelerde çok miktarda bulunan β -aktin (internal kontrol) kullanıldı. Primer çiftlerinin dizileri Tablo 3-6' da yer almaktadır. Hedef gen ekspresyon seviyesi analizleri yapılan bu genler rölatif kantitasyon yöntemleri kullanılarak incelendi.

CD133 primerleri ile yapılan deneyler sonucunda, CD133+ hücrelerde CD133 ifade düzeyinin bütün örneklerde CD133- olanlara göre çok daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4-5). Bütün örnekler birlikte değerlendirildiğinde CD133+ hücrelerde CD133 ifade düzeyinin CD133- olanlara göre $6,32 \pm 0,87$ kat artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-6, $p < 0,001$). Bu şekilde CD133 yüzey işaretçisi ile hücre ayırıştırma işleminin gerçek zamanlı PZR ile de doğrulanması yapılmış oldu.



Şekil 4-5: CD133+ ve CD133- hücrelerde CD133 ifade düzeyi



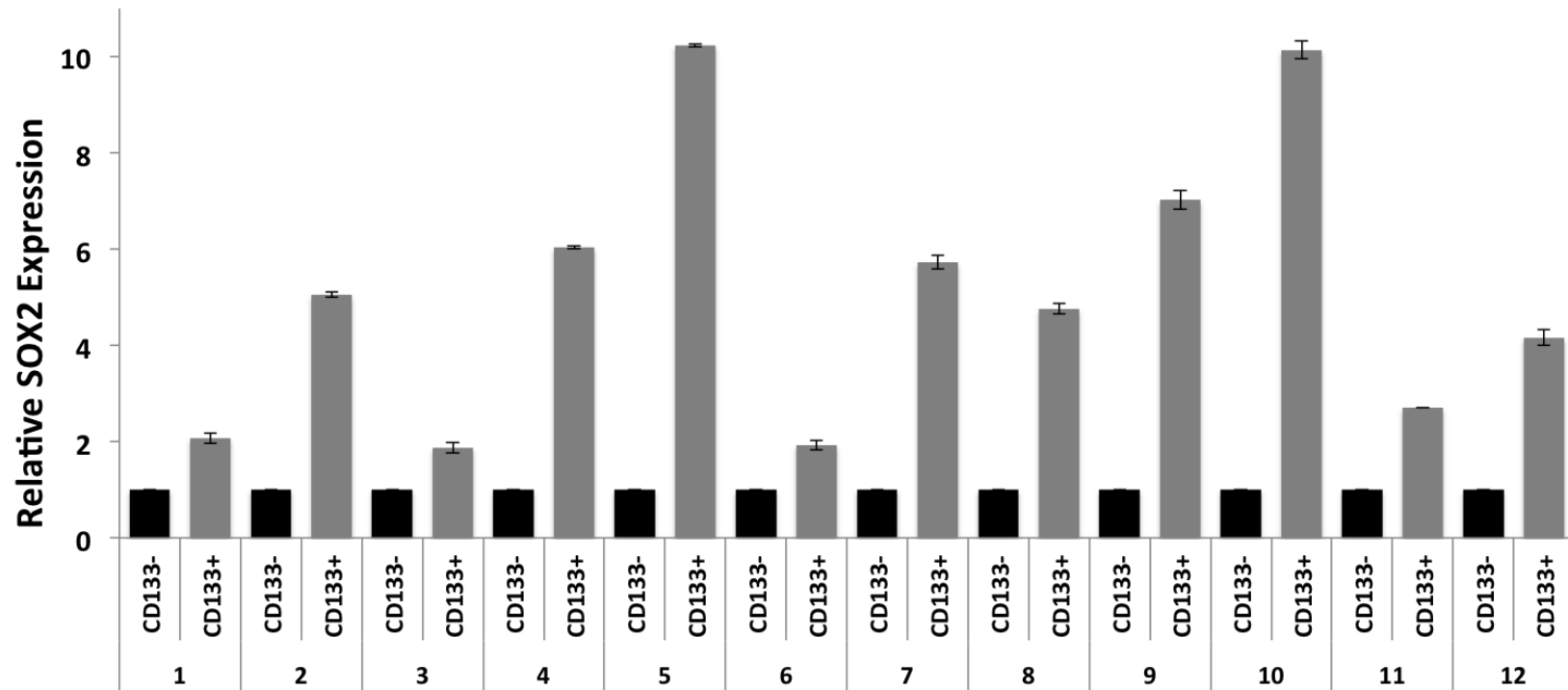
Şekil 4-6: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CD133 ifade düzeyi

4.7. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayrıştırılan CD133+ Hücrelerin Kök Hücre Karakterizasyonlarının qRT-PZR ile Değerlendirilmesi

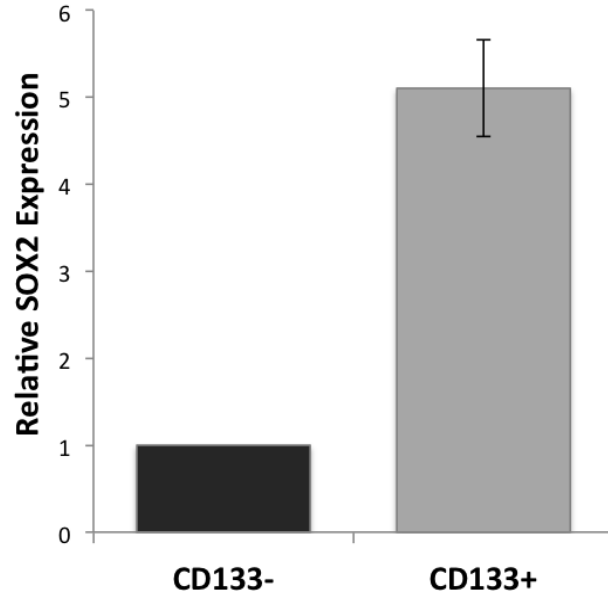
Ayrıştırma sonrası akım sitometri ve qRT-PZR ile doğrulaması yapılan CD133 pozitif ve negatif hücrelerin kök hücre karakteristiklerinin kontrol edilmesi için SOX2, OCT4, KLF4 ve ABCG2 primerleri, CD133 ve CD44 yüzey işaretçilerinin korelasyonlarının test edilebilmesi için de CD44 primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı ve kontrol olarak hücrelerde çok miktarda bulunan β -aktin (internal kontrol) kullanıldı. Primer çiftlerinin dizileri Tablo 3-6' da yer almaktadır. Hedef gen ekspresyon seviyesi analizleri yapılan bu genler rölatif kantitasyon yöntemleri kullanılarak incelendi.

25 adet CD133+ ve CD133- hücre çiftinden 12 çiftin RNA konsantrasyonları cDNA sentezi için yeterli bulundu.

SOX2 ifade düzeyi analiz edildiğinde bütün örneklerde SOX2 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde CD133- hücelere kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. SOX2 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde ortalama $5,10 \pm 0,55$ kat arttığı gösterildi (Şekil 4-7, Şekil 4-8, $p < 0,001$).

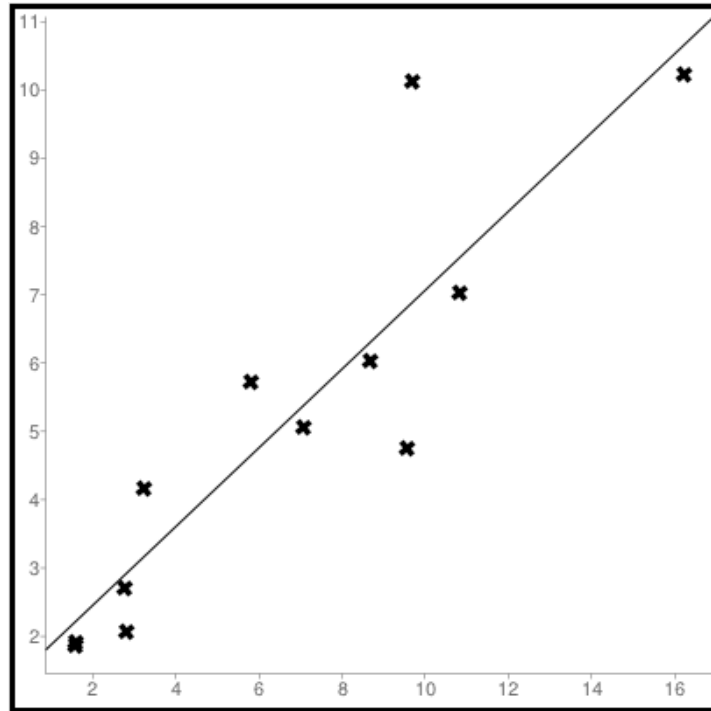


Şekil 4-7: CD133+ ve CD133- hücrelerde SOX2 ifade düzeyi



Şekil 4-8: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama SOX2 ifade düzeyi

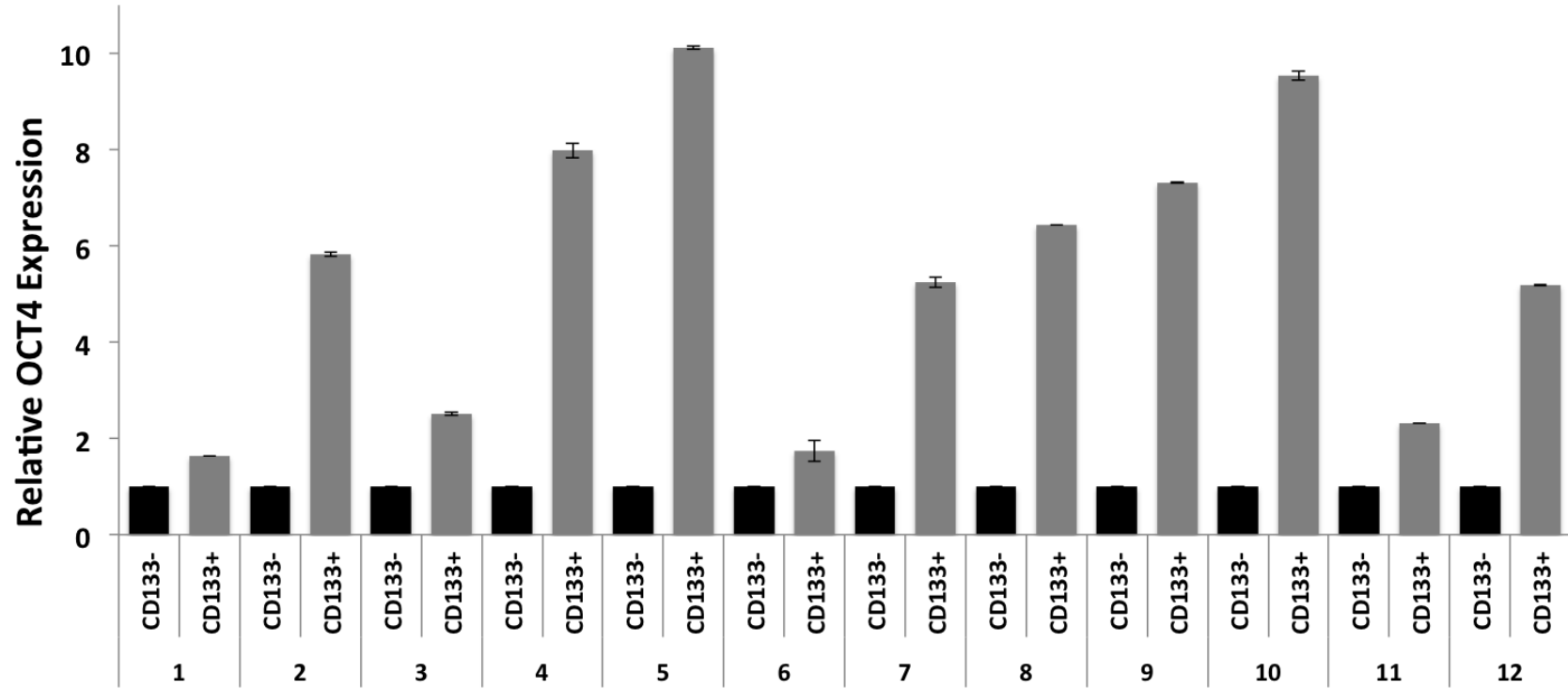
Ayrıca SOX2 ifadesinin CD133 ile kuvvetli bir korelasyona sahip olduğu Pearson korelasyon testi kullanılarak gösterildi (Şekil 4-9, $R=0,89$).



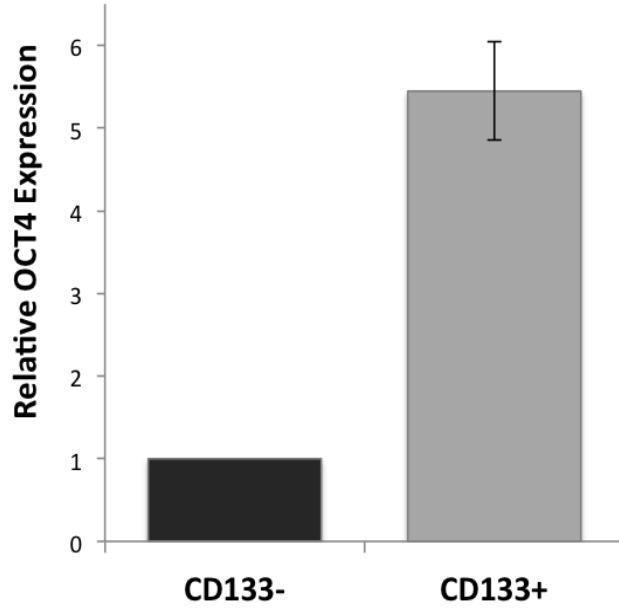
Şekil 4-9: SOX2 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun scatter plot gösterimi

(y eksenini SOX2 ifade düzeylerini, x eksenini CD133 ifade düzeylerini göstermektedir)

Bir diğer kök hücre işaretçisi OCT4 ifade düzeyi analiz edildiğinde bütün örneklerde OCT4 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde CD133- hücelere kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. OCT4 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde ortalama $5,44 \pm 0,59$ kat arttığı gösterildi (Şekil 4-10, Şekil 4-11, $p < 0,001$).

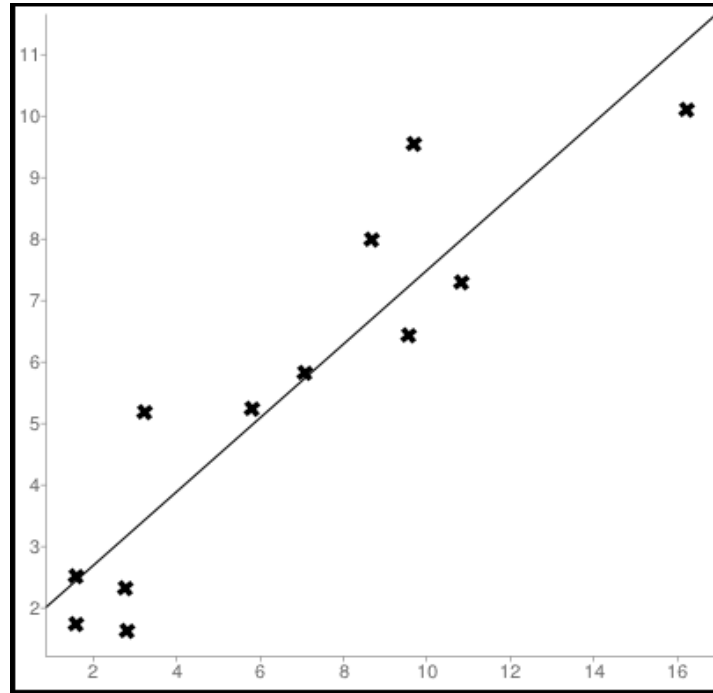


Şekil 4-10: CD133+ ve CD133- hücrelerde OCT4 ifade düzeyi



Şekil 4-11: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama OCT4 ifade düzeyi

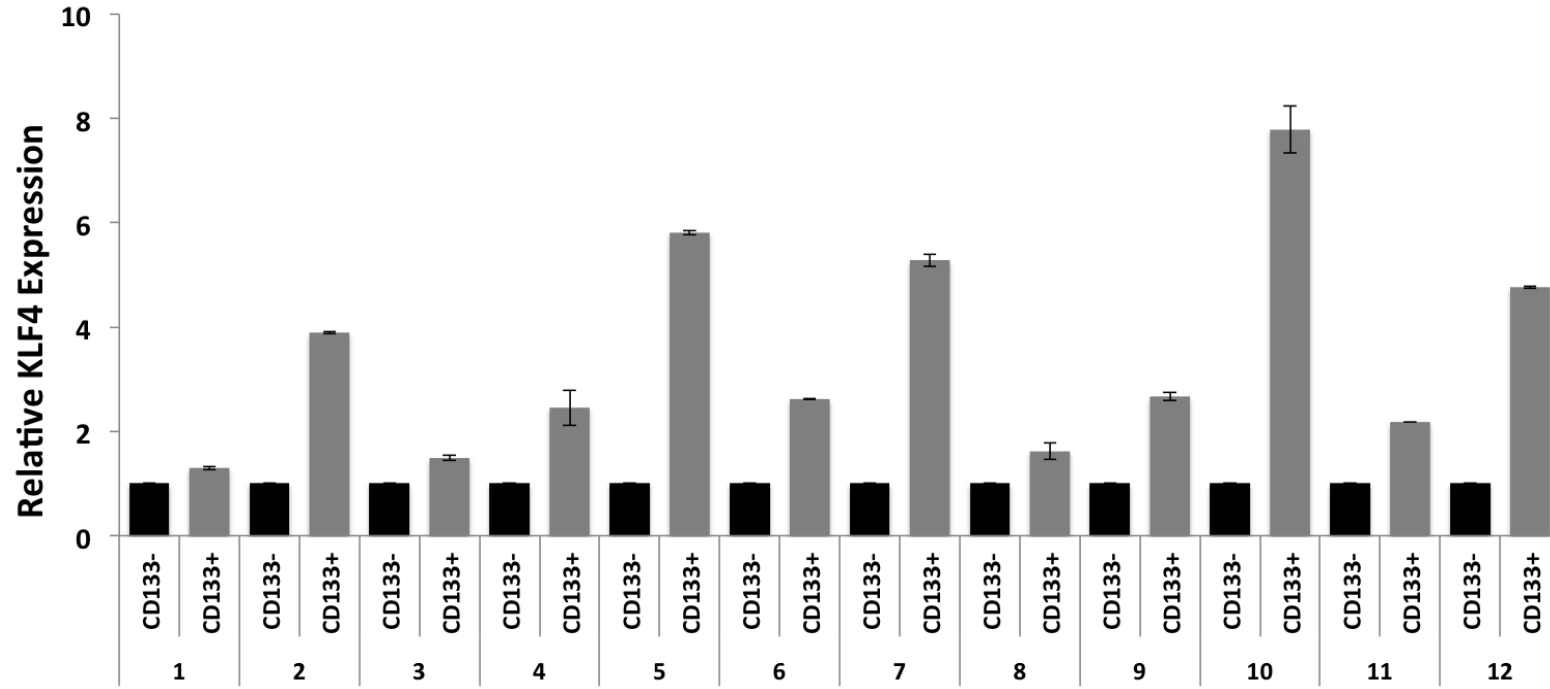
OCT4 ifadesinin CD133 ile kuvvetli bir korelasyona sahip olduğu da Pearson korelasyon testi kullanılarak gösterildi (Şekil 4-12, $R=0,91$).



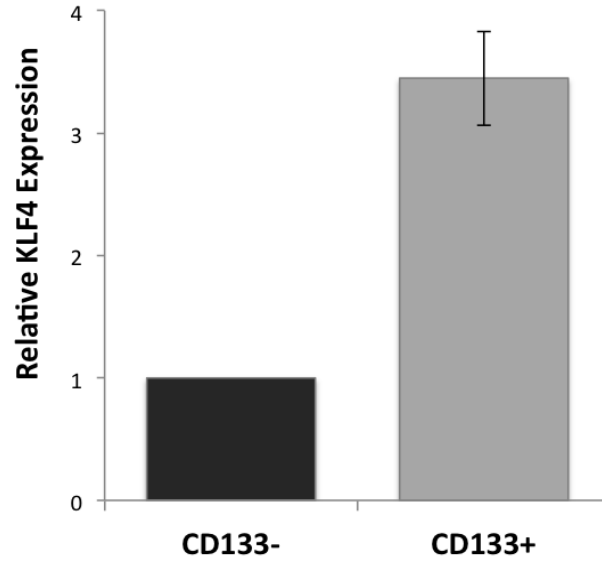
Şekil 4-12: OCT4 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun scatter plot gösterimi

(y eksenini OCT4 ifade düzeylerini, x eksenini CD133 ifade düzeylerini göstermektedir)

Kök hücre işaretçilerinden KLF4 ifade düzeyi analiz edildiğinde bütün örneklerde KLF4 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde CD133- hücrelere kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. KLF4 ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde ortalama $3,44 \pm 0,38$ kat arttığı gösterildi (Şekil 4-13, Şekil 4-14, $p < 0,001$).

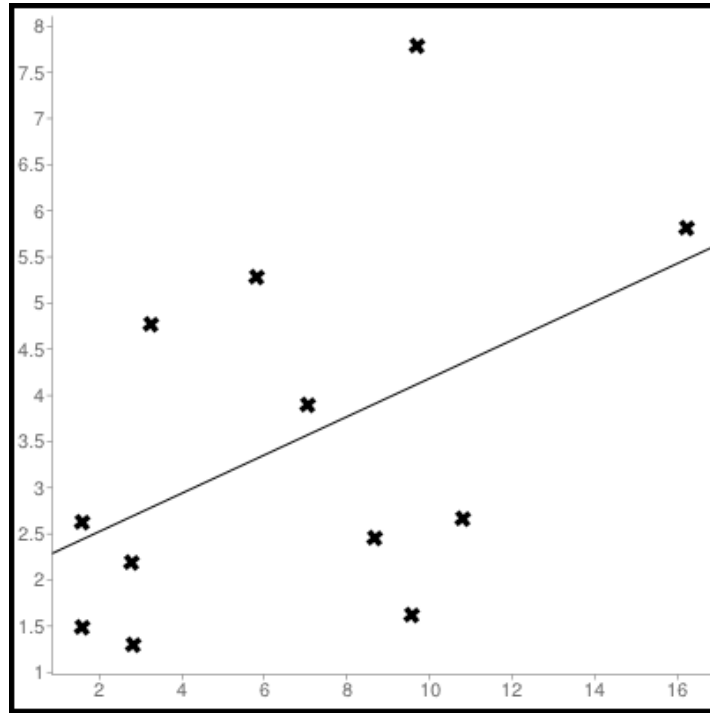


Şekil 4-13: CD133+ ve CD133- hücrelerde KLF4 ifade düzeyi



Şekil 4-14: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama KLF4 ifade düzeyi

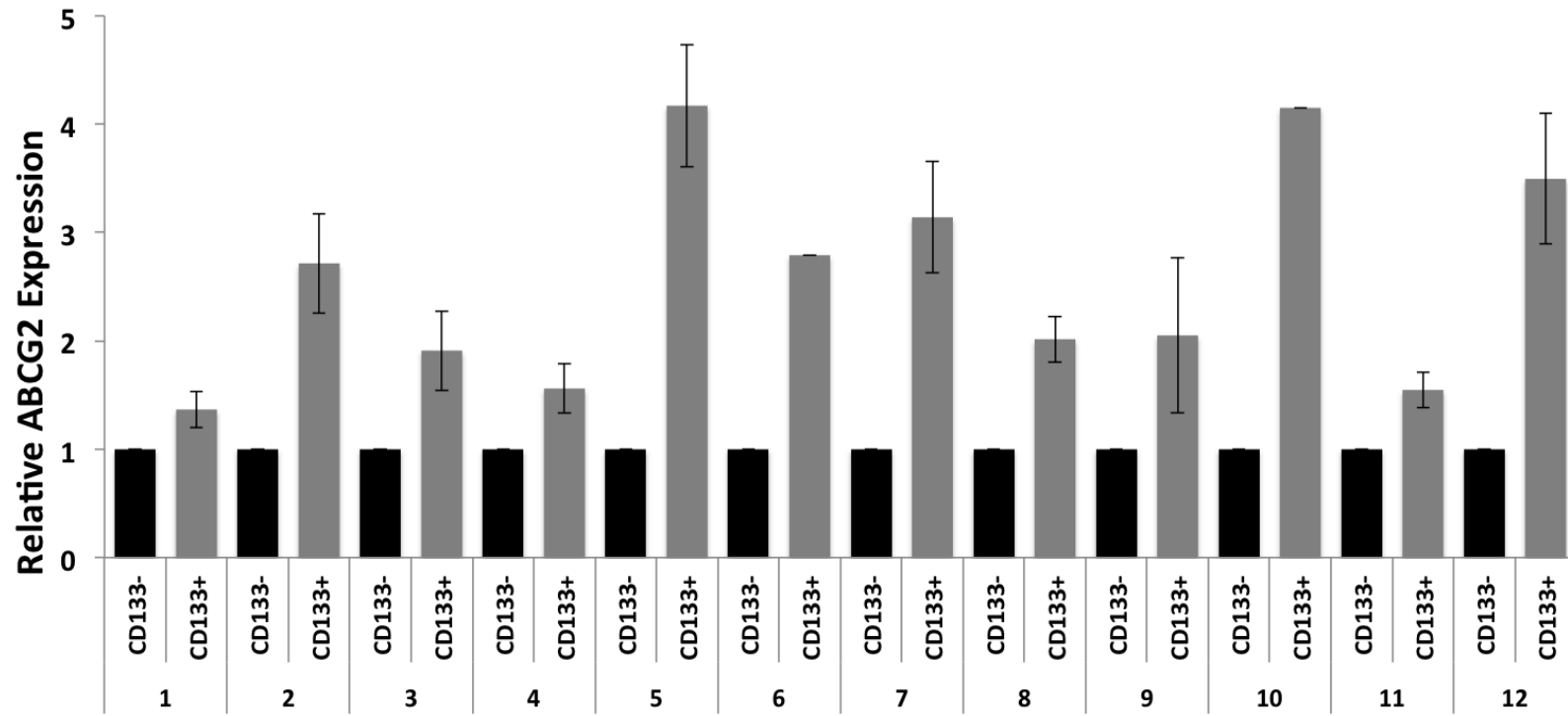
KLF4 ifadesinin CD133 ile SOX2 ve OCT4 kadar olmasa da pozitif bir korelasyona sahip olduğu Pearson korelasyon testi kullanılarak gösterildi (Şekil 4-15, $R=0,46$).



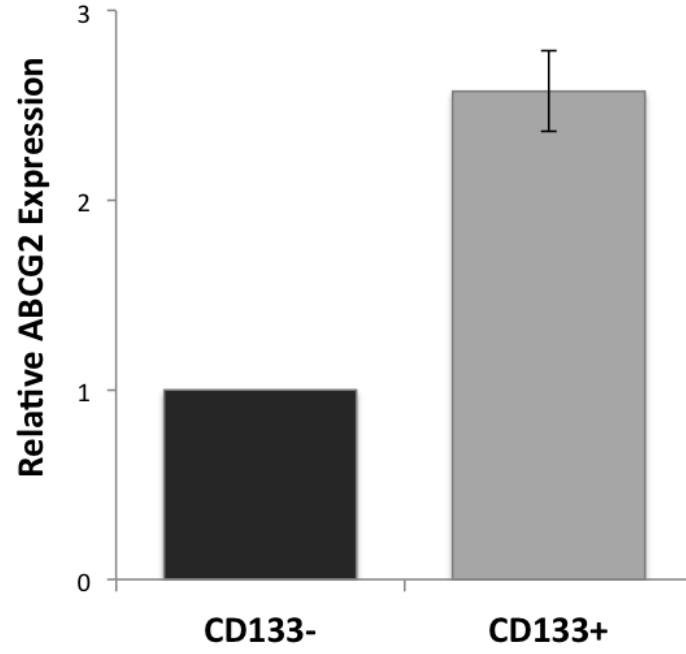
Şekil 4-15: KLF4 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi

(y eksenini KLF4 ifade düzeylerini, x eksenini CD133 ifade düzeylerini göstermektedir)

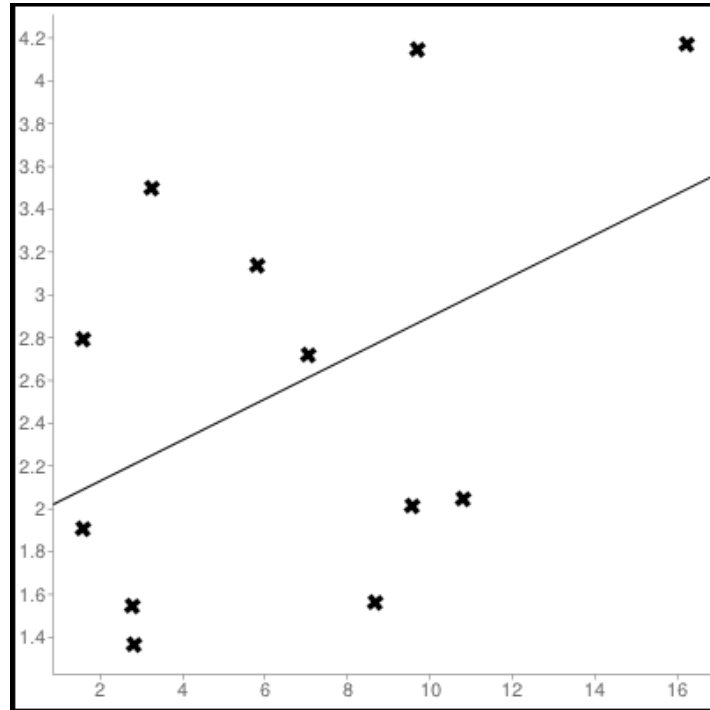
Kök hücre işaretçileri olarak bilinen aynı zamanda tümörlerde kemorezistans ile ilişkilendirilmiş iki önemli faktör olan ABCG2 (Şekil 4-16, Şekil 4-17, $p<0,001$) ve CXCR4 (Şekil 4-19, Şekil 4-20, $p<0,001$) ifade düzeylerinin de CD133+ hücrelerde CD133- hücrelere kıyasla ortalama $2,57 \pm 0,21$ ve $3,13 \pm 0,35$ kat arttığı gösterildi.



Şekil 4-16: CD133+ ve CD133- hücrelerde ABCG2 ifade düzeyi

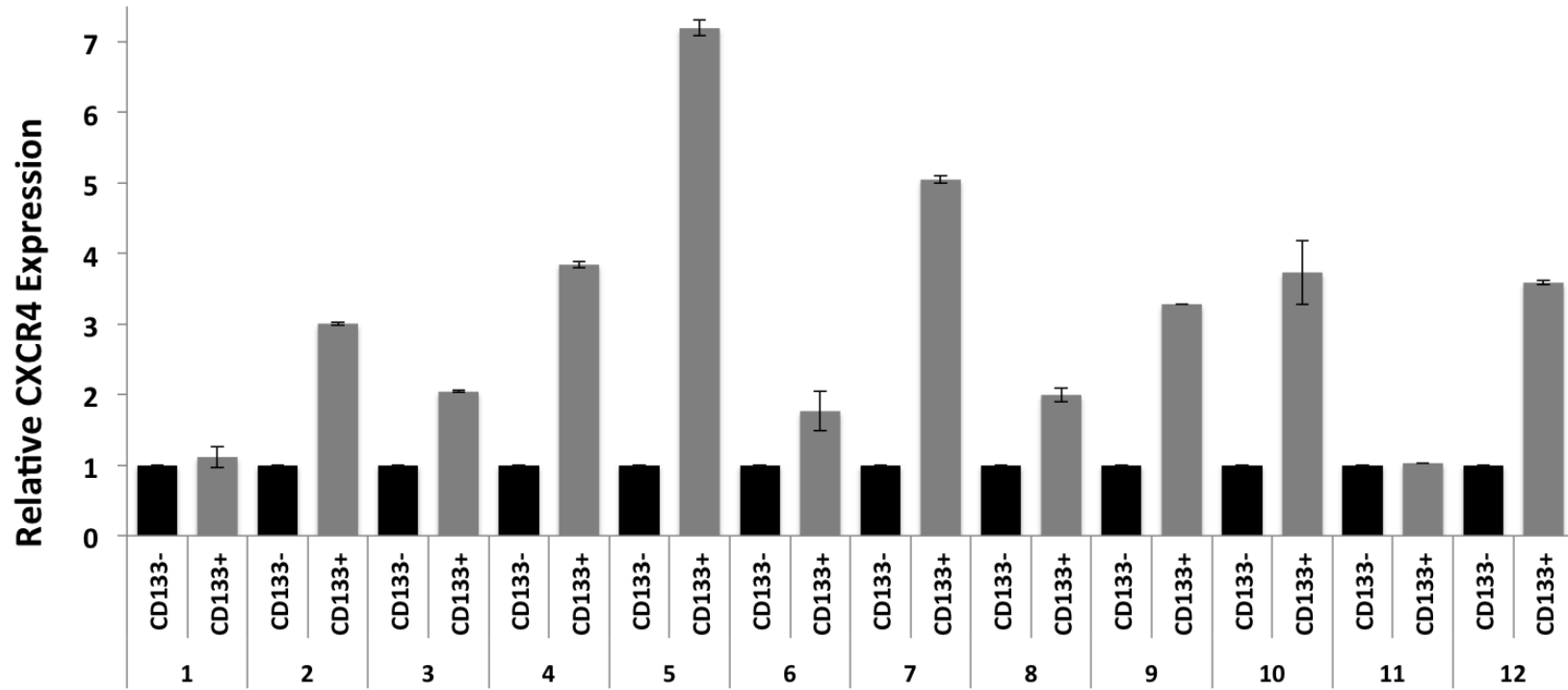


Şekil 4-17: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama ABCG2 ifade düzeyi

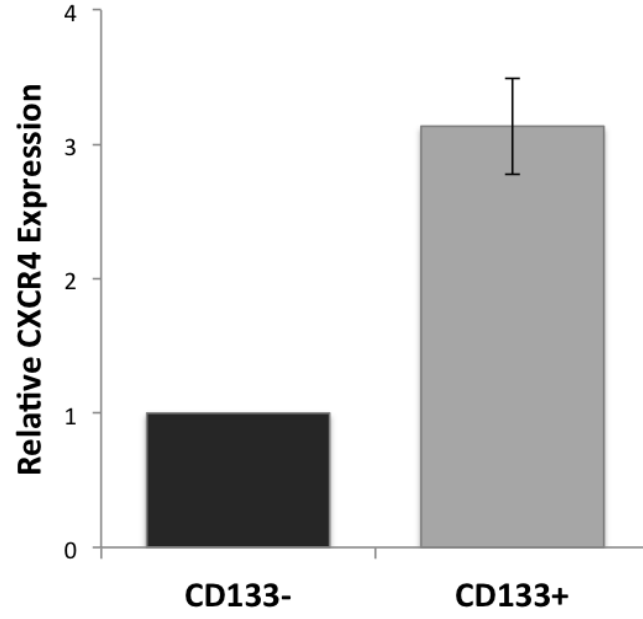


Şekil 4-18: ABCG2 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi
(y eksen ABCG2 ifade düzeylerini, x eksen CD133 ifade düzeylerini göstermektedir)

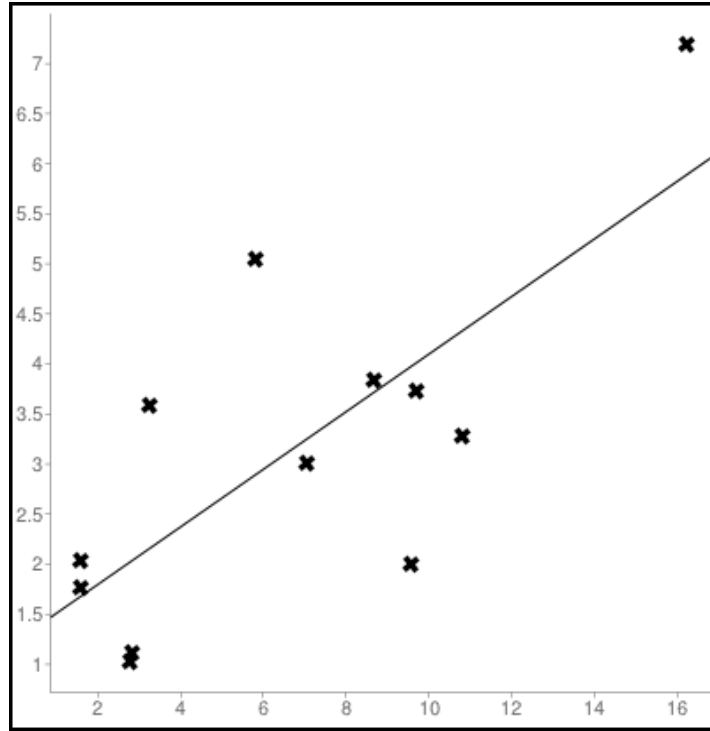
ABCG2 (Şekil 4-18, $R=0,44$) ve CXCR4 (Şekil 4-21, $R=0,74$) ifadelerinin de CD133 ile pozitif bir korelasyon gösterdiği ve CXCR4'ün ABCG2'ye göre daha güçlü bir korelasyona sahip olduğu Pearson korelasyon testi kullanılarak gösterildi.



Şekil 4-19: CD133+ ve CD133- hücrelerde CXCR4 ifade düzeyi



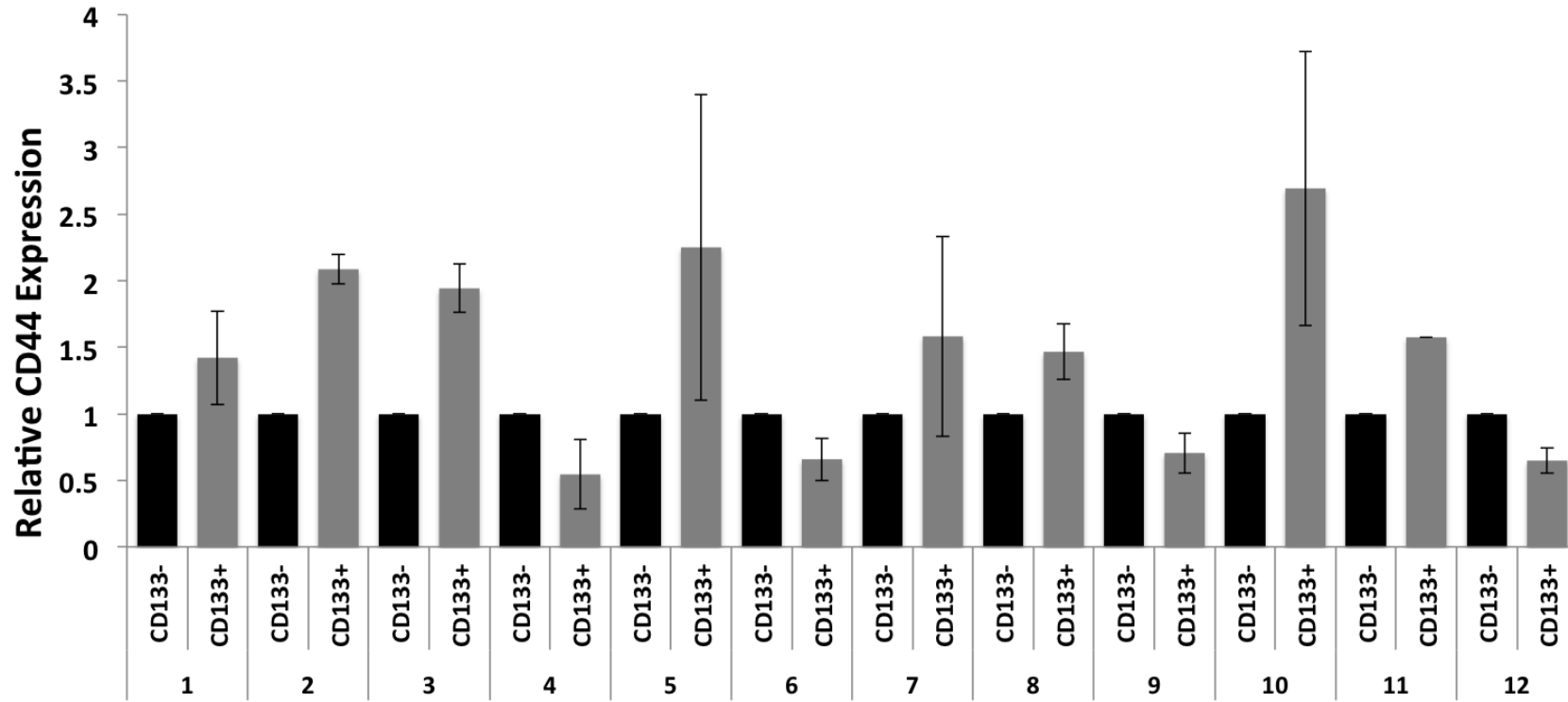
Şekil 4-20: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CXCR4 ifade düzeyi



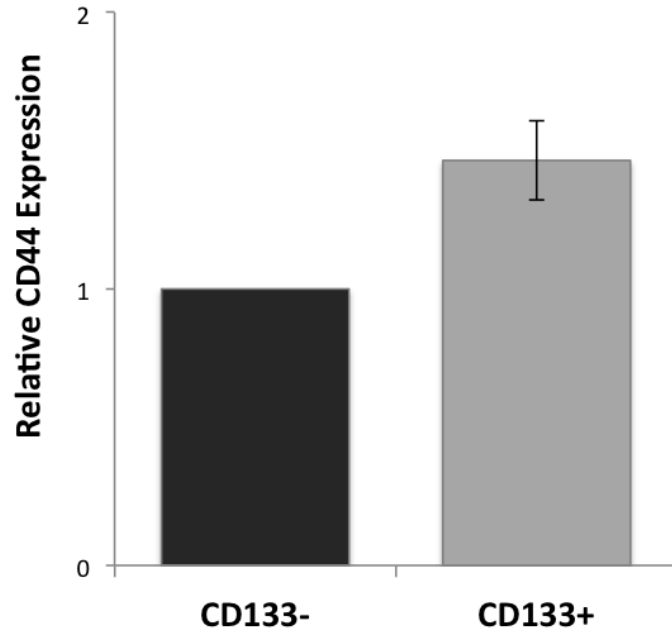
Şekil 4-21: CXCR4 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun scatter plot gösterimi

(y eksenini CXCR4 ifade düzeylerini, x eksenini CD133 ifade düzeylerini göstermektedir)

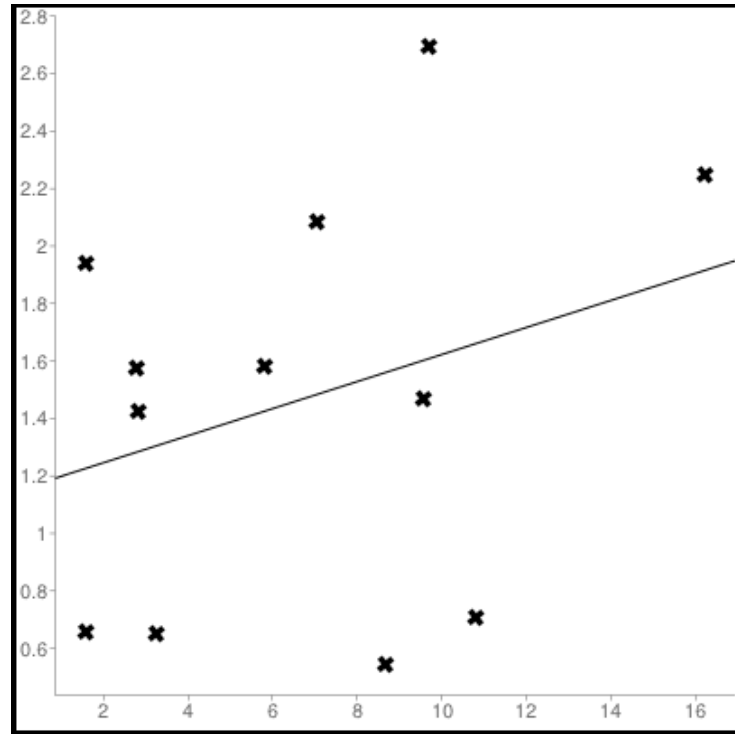
Son olarak hücre ayırtırmada kullanılan diğer bir yüzey işaretçisi olan CD44'ün ifade düzeyinin CD133+ hücrelerde sadece ortalama $1,46 \pm 0,14$ kat arttığı (Şekil 4-22, Şekil 4-23, $p=0,03$) ve CD44 ifadesinin CD133 ile çok zayıf bir korelasyona sahip olduğu gösterildi (Şekil 4-24, $R=0,3$).



Şekil 4-22: CD133+ ve CD133- hücrelerde CD44 ifade düzeyi



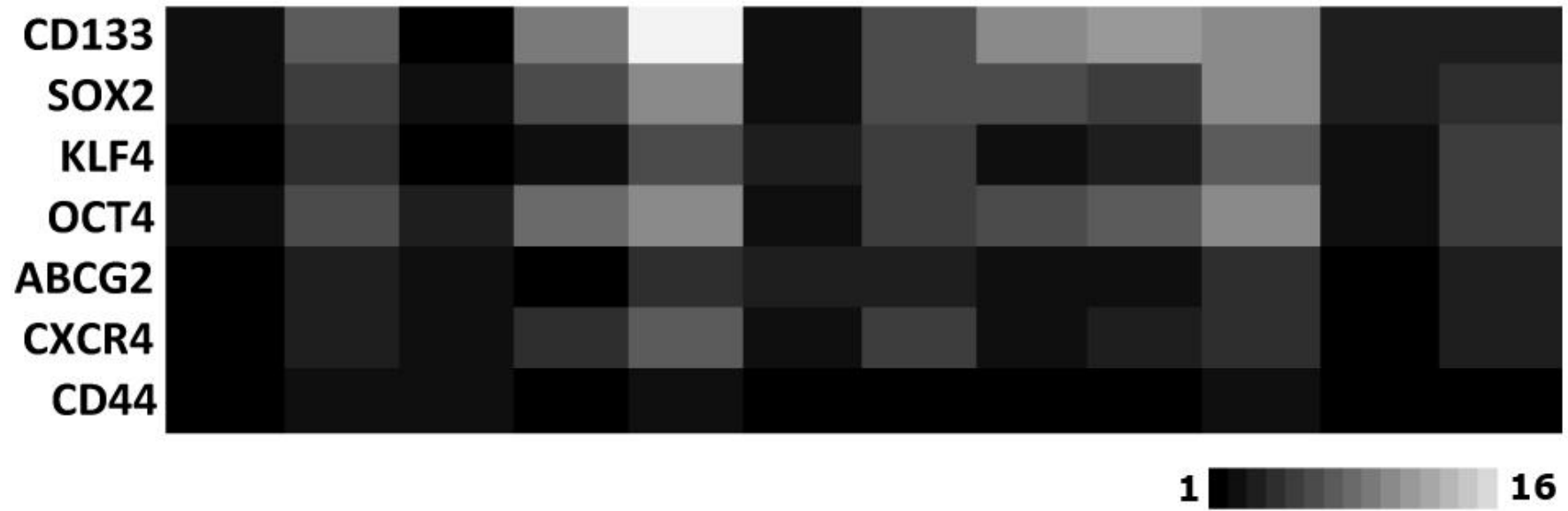
Şekil 4-23: CD133+ ve CD133- hücrelerde ortalama CD44 ifade düzeyi



Şekil 4-24: CD44 ve CD133 ifade düzeylerinin korelasyonunun skatter plot gösterimi

(y ekseni CD44 ifade düzeylerini, x ekseni CD133 ifade düzeylerini göstermektedir)

Sonuç olarak, elde edilen veriler test edilen genlerin kanser kök hücreleri açısından zenginleşmiş olan CD133+ hücrelerde CD44 haricindeki genlerin birbirleri ile yüksek korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4-25). Ayrıca bu korelasyon Kruskal-Wallis testi kullanılarak da gösterildi ($p < 0,0001$), bu da CD133 yüzey işaretçisinin tümör dokusundan kök hücre ayrıştırmada kullanılmasının doğruluğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4-25: Analiz edilen genlerin ifade düzeylerinin heatmap gösterimi

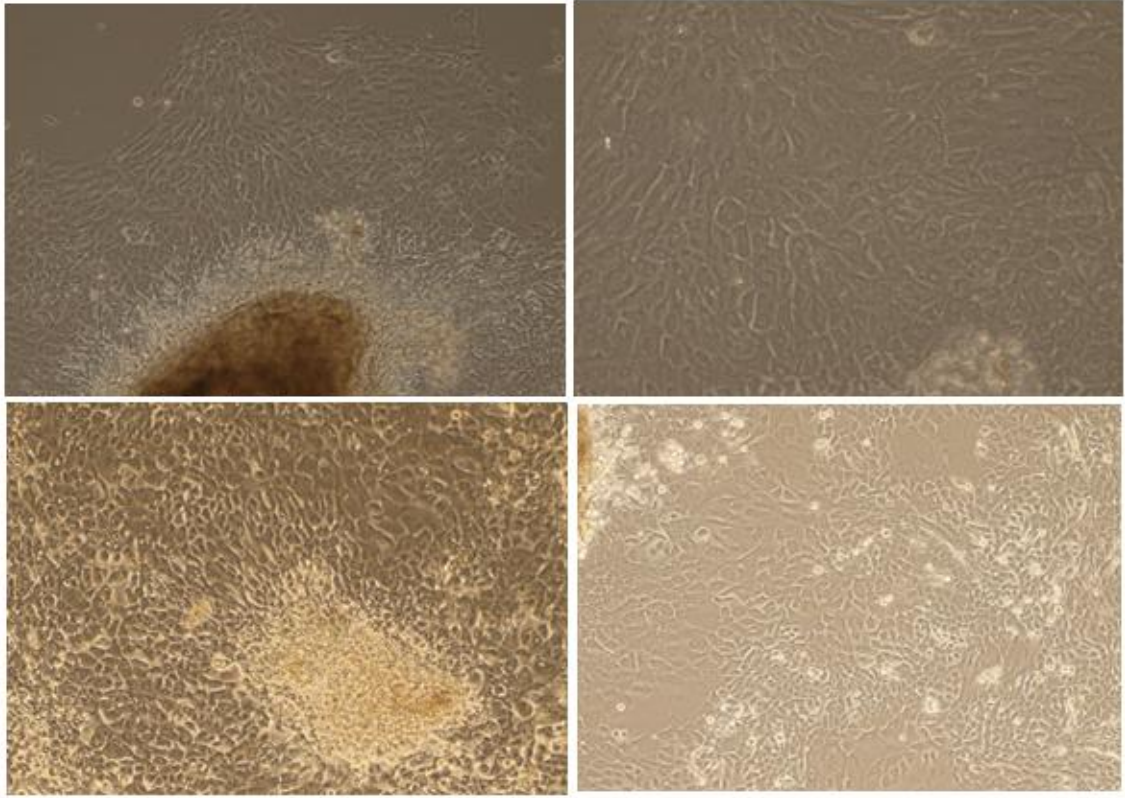
4.8. Taze Larenks Tümör Dokularından Ayırıştırılan CD133+ Hücrelerin Kültür Edilmesi Çalışmaları

Ayırıştırılan hücrelerin RNA derişimlerinin düşük olması göz önüne alınarak alternatif ikinci yol olarak, ayırıştırma işlemi sonrasında hücrelerden direkt RNA izolasyonu yapılması yerine CD133+ hücrelerin kök hücre besi yeri içerisinde çoğaltılıp yeterli miktarda hücre üretildikten sonra deneylere devam edilmesi için çalışmalar yapıldı. Kök hücre kültürü için gerekli olan besi yeri bileşenleri, daha önce literatürde de kullanıldığı gibi şu şekilde belirlendi; bFGF (20 ng/mL), epidermal growth factor (EGF, 20 ng/mL), insulin (5 µg/mL). Kök hücre besi yerinde çoğaltılan hücrelerin kök hücre özelliklerini kaybetmedikleri ve farklılaşmadıkları bilinmektedir. Bu şekilde kök hücreler çoğaltılıp daha verimli bir şekilde RNA temini gerçekleştirilmesi ve böylelikle kök hücre karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi hedeflendi. Yapılan çalışmalar neticesinde CD133 yüzey işaretçisi yardımıyla ayırıştırılan hücrelerin kök hücre besi yeri içerisinde kültür edilmelerinin teknik birçok sebepten dolayı yapılamadığı gözlemlendi. Örneğin, hücre ayırıştırması sonucunda hücrelerin stres yaşamış olmaları ve çok az sayıda CD133+ hücre olması bu nedenler arasında gösterilebilir. Daha sonrasında CD133+ hücrelerin normal hücre besi yeri (%1 PSA, %1 L-Glu ve %10 FBS içeren RPMI1640) içerisinde çoğaltılması denendi ancak yine çoğalmadıkları ve bir süre sonra öldükleri gözlemlendi.

4.9. Taze Larenks Tümör Dokularından Oluşturulan Primer Kültür Hücrelerinden Küre Oluşturulması ve Bu Kürelerin Kök Hücre Karakterizasyonlarının qRT-PZR ile Değerlendirilmesi

4.9.1. Primer Kültürlerin Oluşturulması

Ameliyat sonrası Fetal Bovin Serum (FBS) eklenmemiş ve %1 PSA içeren RPMI besi yeri içerisinde alınan tümör dokularından kanser kök hücre ayırıştırması yapılmasıyla eş zamanlı primer kültür hattı oluşturma işlemlerine başlandı. Oluşturulan primer kültür hücre hatlarının kök hücre besi yerinde büyütülerek kök hücre zenginleştirilmesi yapılması amaçlandı. Diğer yandan ise kontrol grubu olarak normal hücreler için kullanılan besiyeri (%10 FBS, %1 PSA ve %1 L-Glu içeren RPMI 1640) içerisinde de primer kültür yapıldı. Bu doğrultuda primer kültürler 3.pasaja kadar pasajlanıp %10 DMSO içeren Fetal Calf Serum (FCS) solüsyonunda -80°C’ de saklandı. Primer kültür hücreleri için örnek bir görüntü Şekil 4-26’ de verilmektedir.



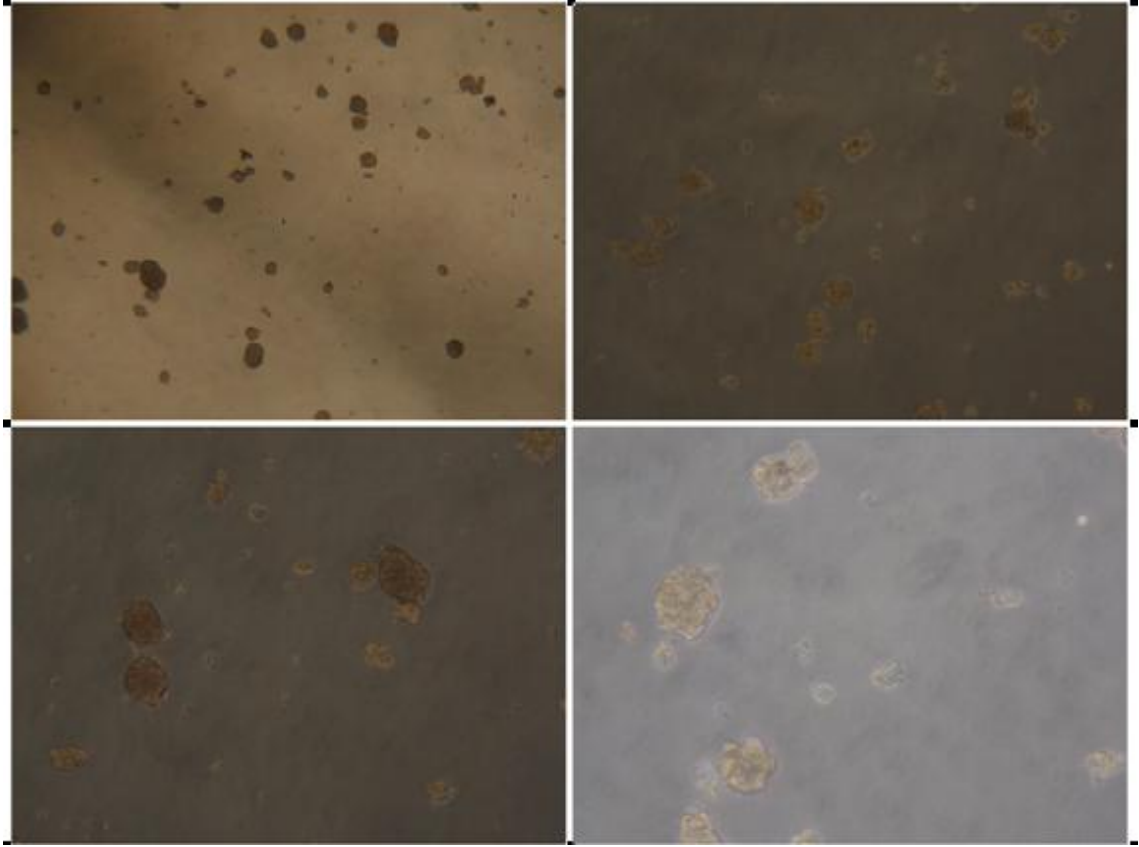
Şekil 4-26: Primer kültür hücrelerinin invert mikroskopta elde edilmiş örnek görüntüleri

4.9.2. Küre Oluşturma Deneyi ve Oluşan Kürelerde qRT-PZR ile Kök Hücre Karakterizasyonu

Kök hücre medyumunda büyütülüp kök hücre zenginleştirilmesi yapılması amacıyla kullanılan primer kültür hücre hatlarından biri, kök hücre medyumunda kültür edilme işlemlerinin optimizasyon çalışmalarında kullanıldı.

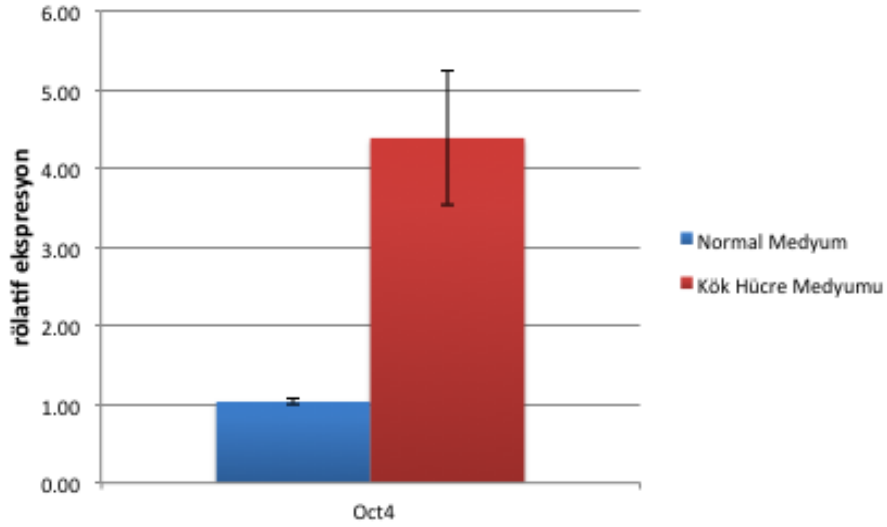
Kök hücre kültürü yapılırken hücrelerin flask yüzeyine minimum düzeyde tutunmaları gerekmektedir. Hücrelerin yüzeye tutunamadıkları ortamda “küre” oluşturarak kök hücre zenginleşmesine yol açtığı bilinmektedir. Bu sebeple hücreler kök hücre medyumuna olarak hazırlanan besiyerinde çözülerek düşük bağlanma kapasiteli (Low attachment) 96 kuyucuklu plate'lere kuyucuk başına 3000 hücre gelecek şekilde 2 tekrarlı olarak ekildi ve %5 CO₂ ile 37°C koşullarında kültür edildi. Küre oluşumu için 3 günde bir pasajlama yapıldı (135). 10 gün sonunda oluşan kürelerden TRizol ile RNA izolasyonu yapıldı ve normal besi yerinde büyütülen hücreler kontrol olarak kullanılarak kök hücre işaretçisi genlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

Primer kültür hücrelerinin uygun kök hücre kültür koşullarında oluşturdukları küreler Şekil 4-27’ de değişik büyütme koşullarında görülmektedir.

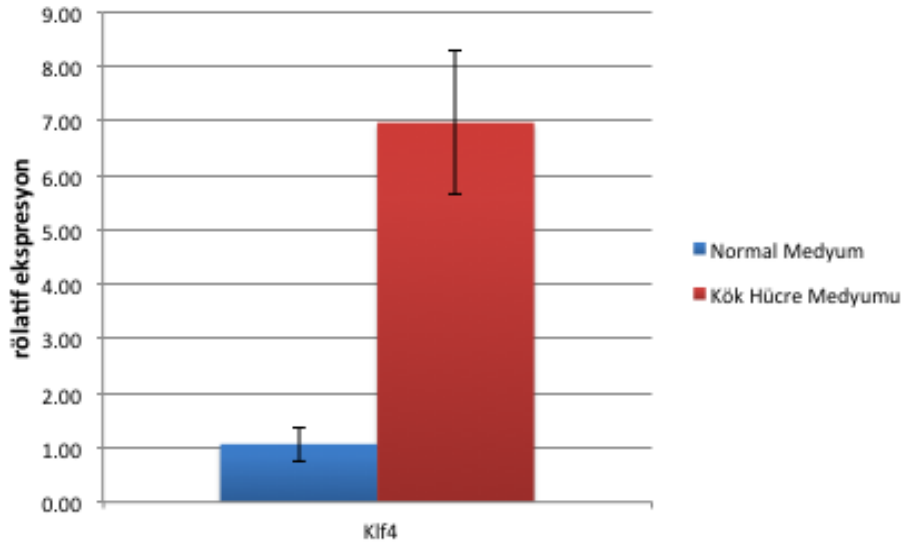


Şekil 4-27: Primer kültür hücrelerinin uygun kök hücre kültür koşullarında oluşturdukları küre görüntüleri (x10 ve x40)

Elde edilen sonuçlar Şekil 4-28 ve 4-29’ da gösterilmektedir. Kök hücre işaretçisi genlerinden Oct4 ve Klf4 genlerinin ifade düzeyleri değerlendirildiğinde kök hücre besi yerinde büyütülen primer kültür hücrelerinde normal besi yerinde büyütülenlere göre 5 ile 10 kat arasında artış gözlenmiştir.



Şekil 4-28: Düşük bağlanma kapasiteli (Low attachment) platelerde normal besi yeri ve kök hücre besi yerinde kültür edilen primer kültür hücrelerinde Oct4 gen ekspresyon düzeyi karşılaştırılması



Şekil 4-29: Düşük bağlanma kapasiteli (Low attachment) platelerde normal besi yeri ve kök hücre besi yerinde kültür edilen primer kültür hücrelerinde Klf4 gen ekspresyon düzeyi karşılaştırılması

Bu deneyler sonucunda larenks tümörü primer kültürlerden oluşturulan kürelerde kök hücre işaretçilerinin ifade düzeylerinin arttığı gösterilerek bu kürelerin larenks kanserinde kanser kök hücrelerinin araştırılmasında kullanılabileceği ortaya konulmuş oldu.

5. TARTIŞMA

Kanser oluşum mekanizmaları ile ilgili ilk görüşler mutasyona uğramış tek bir hücrenin homojen klonundan tümör kütesinin oluştuğu yönündedir. Ancak bugün kanser kök hücre teorisi, tümörün içinde tümör oluşturma potansiyeli açısından farklı olan heterojen hücre popülasyonlarının bulunduğunu önermektedir. Tümörün başlamasını ve devamını sağlayan kök hücre benzeri olan kanser kök hücrelerin kemoterapi ve radyoterapiye dirençli olmaları, günümüz tedavilerinin çoğunlukla neden tümörü küçültebilirken tamamen yok edemediğini açıklayabilir (118).

Larenks kanseri insidansının her yıl yaklaşık 160.000 yeni vaka ile stabil olduğu bildirilmektedir (182). Baş boyun bölgesindeki kanserler arasında en sık görülen ikinci kanser olan skuamöz hücreli larenks kanserinde en büyük karsinojenik ajanın sigara olduğu bilinmektedir (183, 184). Larenks kanseri daha çok orta yaş ve üzeri erkeklerde görülmektedir (31). Son yıllarda diğer kanser hastalarının hayatta kalma süreleri tedavilerle farklı derecelerde uzarken, laringokarsinoma hastalarında sağkalım oranının %57,1' den %51,9' a düştüğü bildirilmiştir. Erken evre larenks kanserlerinde (I ve II) sağkalım oranları yüksekken, ileri evre larenks kanserlerinde (III ve IV) sağkalım oranları düşüktür (185, 186).

Son yıllarda kanser üzerindeki çalışmalar moleküler ve hücresel analizlere odaklanmıştır (9, 129). Özellikle tümörün heterojenik hiyerarşiye sahip olmasının yani tümör dokusunun kanser hücrelerine ek olarak kanser kök hücre içerdiğinin anlaşılmasıyla birlikte bu durum hız kazanmıştır. Kök hücre yüzey işaretçi proteinleri aracılığıyla çok sayıda kanserde mevcut olan kanser kök hücreler ayrıştırılıp karakterize edilebilmiştir. Glikoprotein yapıda olan CD133 de bu işaretçi proteinlerdendir. CD133+ hücre popülasyonunun, larengeal karsinomalar da dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde kanser kök hücreleri açısından zengin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (134, 165, 187, 188).

Tümör dokusu içinde bulunan ve kök hücre özelliği taşıyan kanser kök hücreler yeni bir tümör oluşturabilme potansiyeline sahiptir (189). Kanser kök hücrelerin tümör hücrelerinin sadece küçük bir bölümünü oluşturdukları (190) ve hayvan modellerine çok az sayıda enjekte edildiklerinde bile kanseri başlatabilme potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir (151).

Larenks kanseri için yapılan hücre yüzey işaretçilerine yönelik çalışmalar; tedavi sonrası nüks olup olmayacağının öngörülebilmesinde ve normal doku kök hücrelerine zarar vermeden sadece kanser kök hücreleri hedefleyen tekniklerin geliştirilebilmesinde yarar sağlayabileceğinden önem taşımaktadır (10). CD133 yüzey işaretçisi, kanser kök hücre biyolojisi hakkında yeterli bilgi sağlamayan *in vitro* ortamda Hep-2 hücrelerinde kanser kök hücrelerini zenginleştirmek için kullanılmıştır. CD133+ Hep-2 hücrelerinin *in vivo* ve *in vitro* ortamda kemoterapiye artmış direnç göstermelerine ek olarak yüksek klonojenik potansiyel gösterdikleri tespit edilmiştir (165).

Bu tez projesinde ise CD133+ hücreler, doğrudan rezeke edilmiş taze larenks tümör dokularından kanser kök hücrelerini karakterize etmek amacıyla ayrıştırılmıştır. Bu hücrelerin ayrıştırılıp karakterize edilmesinin, kanser kök hücre özellikleri hakkında daha fazla ve hızlı bilgi eldesine izin vereceği düşünülmektedir. Bu tez projesinin sonuçları CD133+ hücrelerin, tümör hücre popülasyonu içindeki kök hücre benzeri hücreler açısından anlamlı bir şekilde zenginleştiğini ve bu hücrelerin kök hücre işaretçisi olan SOX2, OCT4 ve KLF4 genlerini güçlü bir şekilde eksprese ettiğini gösterdi.

Daha önceki prostat kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada SOX2' nin tümör oluşumunu tetikleyici özellikte olduğu ve DU145 hücre hattında yapılan anti apoptotik deneyler sonucunda da SOX-2 düzeyinin artmasına karşın apoptotik proteinlerin düzeyinin azaldığı gözlenmiştir (191). Proliferasyon ve farklılaşmanın düzenlenmesi ile ilgili bir çok hücresel süreçte rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan KLF4' ün embriyonik kök hücre farklılaşmasını koruduğu bildirilmiştir (192). KLF4' ün kolon kanserinde potansiyel tümör süpresör gen olduğu bildirilmiştir (193). Buna karşın meme kanserinde ise KLF4' ün onkogenik etkisi bildirmiştir (194). Pankreatik kanser hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada OCT4' ün miR-335 ile hedeflenmesi sonucu bu mikro RNA' nın tümör süpresör etkisi ortaya konmuştur ve kök hücre gelişimi ile özelliklerinin engellendiği gösterilmiştir (195).

Ayrıca bu tez projesinde CD133+ hücrelerde kemoterapötik ajanlara karşı dirençle ilişkilendirilmiş genlerden ABCG2 ve CXCR4 ifade düzeylerinin de anlamlı bir şekilde arttığı bulundu.

ABCG2 geninin hem normal kök hücrelerde hem de kanser kök hücrelerinde ilaçlara karşı direnç sağladığı bilinmektedir (196, 197). Hep-2 hücre hattında yapılan çalışmalarda CD133+ hücrelerde ABCG2' nin artmış ekspresyonu tespit edilmiştir

(165). ABCG2 (BCRP1) taşıyıcı molekülünün çoklu ilaç direncine sahip kök hücre hatlarında ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (198). Benzer şekilde CD133 ve ABCG2 yüzey proteinlerinin ikisini de eksprese eden akciğer kanser hücrelerinde ABC taşıyıcı proteinlerinin kemorezistans sağlanmasında ve kanser kök hücrelerinin yaşam sürelerinin artmasında rol oynadığı gözlenmiştir (140). CXCR4 geninin de kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara karşı direnç sağlamasında rol oynadığı gösterilmiştir (199). Bunun yanısıra ABCG2 ve CXCR4 genlerinin ekspresyonunun, kemoterapi tedavisinden sonra kanser kök hücrelerde anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (199). Bu yüzden izole edilmiş CD133+ hücrelerde artmış ABCG2 ve CXCR4 ifade düzeyi, kanser kök hücrelerin kemorezistansta ve kanserin tekrarlamasında rol oynayan güçlü adaylar arasında olduğuna dair düşünceleri güçlendirmektedir. Luo ve arkadaşlarının miR-139 ile kemorezistansta rol oynadığı bilinen CXCR4' ü hedeflemeleri sonucu CXCR4 ekspresyonunun azaldığı ve bunun sonucu olarak da Hep-2 hücrelerinin proliferasyon ve metaztazının engellendiği bildirilmiştir (200).

Ayrıca, bu tez projesi sonuçları CD44 ekspresyonunun larengeal skuamöz hücreli karsinomlardaki kanser kök hücrelerde görülen CD133 ekspresyonu ile uyumlu olmadığını gösterdi. Bu sonuç, yakın zamanda yapılmış olan oral skuamöz hücreli karsinomlarda kanser kök hücrelerin ayrıştırılmasına yönelik CD44, CD117 ve CD133 işaretçilerinin kullanılabilirliğini araştıran çalışmanın bulgularını desteklemektedir (201).

Welte ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada primer melanoma kültürlerinden CD133+ kanser kök hücreleri ayırtmak için MACS protokolü değiştirilip optimize edilmiştir (202). Buna karşın bu tez projesinde taze olarak elde edilen tümör dokuları kültür edilmeden doğrudan CD133+ hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılmıştır. Bu yüzden bu çalışma kök hücreleri doğrudan taze rezeke edilmiş larenks tümör dokusundan izole etmede, spesifik olarak bu kanser kök hücreleri hedefleyen ve ileri karakterizasyon çalışmaları aracılığıyla yeni terapötik araçların geliştirilmesine olanak sağlayan CD133' ün kullanılabileceğine dair faydalı bir yaklaşım sunmaktadır.

Kanserin teşhis ve tedavisi ile ilgili olarak son zamanlarda önemli geliştirmeler olmasına rağmen, larenks kanseri hala kanser ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir. Özellikle ileri evredeki larengeal karsinomalarda terapi seçenekleri çoğunlukla pozitif klinik yanıt oluşturulmasında başarısız olmaktadır. Bu

yüzden de yeni terapötik araçlara acilen ihtiyaç söz konusudur. Sessiz ve tedaviye dirençli hücrelerin replikasyonu ile oluşan kanser kök hücrelerini spesifik olarak hedefleyen yeni terapötik ajanların geliştirilmesi kansere karşı savaşta daha etkili olacaktır.

Kanser biyolojisi araştırmaları ile ilgili en önemli sorunlardan biri kanser kök hücreleri doğru bir şekilde ayırtmak ve karakterize etmektir. Çünkü spesifik olarak kanser kök hücreleri hedefleyen yeni terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi için bunun sağlanması çok büyük önem taşımaktadır. Ne var ki, hem kanser kök hücrelerinde ve hem de normal dokudaki kök hücrelerde benzer gen ekspresyonları ve yüzey antijen profilleri mevcuttur. Bu nedenle kanser kök hücreleri hedeflerken normal doku kök hücrelerine zarar vermeyecek yöntem ve yolların araştırılması gerekmektedir (203). Bu nedenle dokuya özgü normal kök hücrelerden kanser kök hücrelerini ayırt etmek için yeni işaretçilere ihtiyaç vardır. Kanser etyopatogenezinde önem kazanan kök hücre çalışmalarının hastalığın teşhisinden tedavisine kadar tüm safhalarda yardımcı olacağı düşünülmektedir. Bu noktada çalışılan kanserle ilişkili işaretçi biyomoleküller oldukça önem kazanmaktadır (204, 205)

Sonuç olarak çalışma kapsamında, kök hücre özelliği ile alakalı genler olan SOX2, OCT4, KLF4, ABCG2 ve CXCR4' ün ifade düzeylerinin artmış olduğu, taze larenks doku örneklerinden ayırıştırılan CD133+ hücrelerin kanser kök hücre benzeri hücreler açısından zenginleştiği ve de tümörü kemoterapötik ajanlara karşı dirençli yapma potansiyeline sahip oldukları gösterildi. Ayrıca CD44 ekspresyonunun, larengeal skuamöz hücreli karsinomlardaki kanser kök hücrelerde görülen CD133 ekspresyonu ile uyumlu olmadığı da gösterilmiş oldu.

Bu çalışmanın devamı niteliğinde CD133 ile ayırıştırma yapılan hücrelerde hastalıkların karakterizasyonunda çok önemli gelecek vaat etmekte olan miRNA ekspresyon profillerine bakılabilir. miRNA profillerine mikroarray yöntemi ile bakılarak saptanan farklı profildeki miRNA'lar in vitro olarak primer kanser kök hücrelerine ve larenks kanseri hücre hatlarına transfekte edilerek proliferasyon üzerindeki etkileri de gözlemlenebilir. Saptanacak miRNA profil değişiklikleri, kanser dokularında rekürrens ve metastazda etkin rol oynadığı düşünülen kanser kök hücrelerine yönelik yeni prognoz ve tedavi yaklaşımlarında yardımcı olabilir. Ayrıca farklı miRNA' ların identifikasyonu sayesinde larenks kanserinin biyolojisi daha iyi anlaşılabilir yeni bulgular ile tedavi için yeni yöntemler geliştirmek mümkün olabilir.

Belirlenen mikroRNA'ların işlevlerinin ve etki mekanizmalarının aydınlatılması daha sonraki araştırmalar için de önemli katkı sağlayabilir. Aynı zamanda bir çeşit mikroRNA farklı dokularda farklı genleri hedefleyebildiğinden profillemeye çalışması ile elde edilen mikroRNA'ların larenks normal dokusu ve larenks tümör dokusunda hangi mRNA'ları hedeflediğinin belirlenmesi amacıyla, belirlenen mikroRNA ile transfekte edilen hücre hatlarından RNA ayrıştırılarak, gen ekspresyonu mikroArray' i tekniği uygulanabilir. Bu teknik ile transfekte edilen ve edilmeyen hücre hatları karşılaştırılarak değişim gösteren mRNA'lar belirlenebilir. Ayrıca protein mikroArray yapılarak bulgular protein düzeyinde de değerlendirilebilir. Skuamöz hücreli larenks kanserindeki kanser kök hücrelere yönelik ileri çalışmalar olarak dozaj bağımlı kemoterapi denemeleri, hücre göçü deneyleri, western blot analizi gibi çalışmalar yapılabilir. Bu sayede yeni terapötik girişimler için önemli bulgular elde edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Oktem F, Toprak M, Ada M, Oztürk O. Larinks kanseri etyolojisinde laringofaringeal reflünün yeri. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 2000;**38(1)**:28-32.
2. Meller SM. Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am* 1984;**17(1)**:3-12.
3. Rosai J. Respiratory tract. 9 ed. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. China: Elsevier; 2004. pp. 335-359.
4. Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G ve ark. Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003;**47(1)**:65-80.
5. Sasaki CT, Carlson RD. Malignant neoplasms of the larynx. 2 ed. İçinde: Cummings CW, editor. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. St Louis: Mosby Book; 1986. pp. 1926-1954
6. Castelijns JA. Diagnostic radiology of head and neck oncology. *Curr Opin Oncol* 1991;**3(3)**:512-518.
7. Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg* 2007;**77(6)**:464-468.
8. Kakarala M, Wicha MS. Cancer stem cells: implications for cancer treatment and prevention. *Cancer J* 2007;**13(5)**:271-275.
9. Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers? *Cancer Metastasis Rev* 2008;**27(3)**:459-470.
10. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer* 2005;**41(5)**:683-693.
11. Odar İV. *Anatomi Ders Kitabı*. 7 ed.: Elif Matbaacılık; 1980. 2: pp. 170-188.
12. Kaya S. *Larenks Hastalıkları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yay; 2002. 1,2: pp 19-75.
13. Kirchner JA, Carter D. Pathology of the larynx. 4 ed. İçinde: Mills SE, editor. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. Noida, India: Gopson Papers Ltd; 2004 . pp. 1007-1032.
14. Shah JP. Cancer of the Head and Neck. İçinde: *Atlas of Clinical Oncology*. London: BC Decker Inc; 2001. pp. 156-182.
15. Som PM, Curtin HD. *Head and Neck Imaging*. USA: Mosby; 2003. pp.1595-1700.
16. Lore MJ. *An Atlas of Head and Neck Surgery*. 4 ed. China: Elsevier Inc; 2005. pp.1069-1164.
17. Welsh LW, Welsh JJ, Rizzo TA. Internal anatomy of the larynx and the spread of cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989;**98(3)**:228-234.
18. Weir N. Anatomy of the Larynx and Tracheobronchial tree. 6 ed. İçinde: Alan GK Michael G, editor. *Scott-Brown's Otolaryngology*. Butterworth-Heinemann 1997. pp. 12/1-27.
19. Kozuma S, Nemoto A, Okai T, Mizuno M. Maturation sequence of fetal breathing movements. *Biol Neonate* 1991;**60(1)**: pp.36.
20. Cummings CW. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 3 ed. St Louis: Mosby Book; 1998. pp. 2326-2345.
21. Ozcan O. Solunum sistemi. 1 ed. İçinde: Moore KM Persaud TV, editor. *İnsan Embriyolojisi, Klinik Yönleri İle*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002. pp. 259-60.

22. Koç C. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi*. 1 ed. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003. pp. 1141-1154.
23. http://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%87ok_katl%C4%B1_yass%C4%B1_epitel. 14.04.2014.
24. <http://www.uludagsozluk.com/k/kolumnar-epitel/>. 14.04.2014.
25. Yıldırım F. *Skuamöz hücreli larinks kanserlerinde; Human papillomavirüs varlığı, E-Kaderin ekspresyonları ve bulguların klinikopatolojik değişkenlerle ilişkisinin araştırılması*. Adana: Çukurova Üni.; 2009. pp. 7.
26. 2013 Türkiye' de Kanser Kontrolü. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erişim 15.04.2014, [http://www.kanser.gov.tr/Dosya/Sunular/Kanser Kontrol faaliyetleri 2013.pdf](http://www.kanser.gov.tr/Dosya/Sunular/Kanser_Kontrol_faaliyetleri_2013.pdf);
27. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;**11**(1):9-22.
28. Moore CE, Wiatrak BJ, McClatchey KD, Koopmann CF, Thomas GR, Bradford CR ve ark. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;**120**(5):698-705.
29. Farrag TY, Lin FR, Cummings CW, Sciubba JJ, Koch WM, Flint PW ve ark. Importance of routine evaluation of the thyroid gland prior to open partial laryngectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;**132**(10):1047-1051.
30. Mao Y, Zhang DW, Lin H, Xiong L, Liu Y, Li QD ve ark. Alpha B-crystallin is a new prognostic marker for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;**31**:101.
31. Zhang SY, Lu ZM, Luo XN, Chen LS, Ge PJ, Song XH ve ark. Retrospective analysis of prognostic factors in 205 patients with laryngeal squamous cell carcinoma who underwent surgical treatment. *PLoS One* 2013;**8**(4):e60157.
32. Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Levi F, Negri E, La Vecchia C. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional, and hormonal factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;**12**(6):514-517.
33. 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; 08.04.2014
34. Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN. Baş-boyun ve tiroid kanserleri. *Klinik Onkoloji*, 2000:161-200.
35. Mirisola V, Mora R, Esposito AI, Guastini L, Tabacchiera F, Paleari L ve ark. A prognostic multigene classifier for squamous cell carcinomas of the larynx. *Cancer Lett* 2011;**307**(1):37-46.
36. Gao X, Fisher SG, Mohideen N, Emami B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;**56**(2):427-435.
37. Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2012. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. Erişim 14.04.2014, <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/istaturk2012.pdf>;
38. Hoffmann D, Hecht SS, Ornaf RM, Wynder EL, Tso TC. Chemical studies on tobacco smoke. XLII. Nitrosonornicotine: presence in tobacco, formation and carcinogenicity. *IARC Sci Publ* 1976; (**14**):307-320.
39. Kahn HA. The Dorn study of smoking and mortality among U.S. veterans: report on eight and one-half years of observation. *Natl Cancer Inst Monogr* 1966;**19**:1-125.

40. Zheng W, Blot WJ, Shu XO, Diamond EL, Gao YT, Ji BT ve ark. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in Shanghai, with emphasis on diet. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;**1(6)**:441-448.
41. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Invest* 1992;**70(3-4)**:320-327.
42. Özlügedik S, Ünal A. Baş boyun kanserlerinde epidemiyoloji ve risk faktörleri. KBB Baş Boyun Cerrahisi'nde Güncel Yaklaşım. 2005; **1(3)**: pp. 51-56.
43. Batsakis J. *Tumors of the Head and Neck: Clinical Pathological Consideration*. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1979.
44. Barnes L, Gnepp D. Disease of the larynx, hypopharynx, and esophagus. Barnes L, editor. *Surgical Pathology of the Head and Neck*. New York: Marcel Dekker; 1985. pp. 141-226.
45. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997;**30(1)**:1-19.
46. Tomek MS, McGuirt WF. Second head and neck cancers and tobacco usage. *Am J Otolaryngol* 2003;**24(1)**:24-7.
47. Agudelo D, Quer M, Leon X, Diez S, Burgues J. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. *Head Neck* 1997;**19(3)**:200-204.
48. Demireller A. Larenks kanserleri. İçinde: Koç C, editor. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi*. Ankara: Güneş Kitapevi; 2004. pp. 1183-1187.
49. Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E ve ark. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer* 2002;**87(5)**:516-518.
50. Cohen JT, Bach KK, Postma GN, Koufman JA. Clinical manifestations of laryngopharyngeal reflux. *Ear Nose Throat J* 2002;**81(92)**:19-23.
51. Manjarrez ME, Ocadiz R, Valle L, Pacheco C, Marroquin A, De la Torre C ve ark. Detection of human papillomavirus and relevant tumor suppressors and oncoproteins in laryngeal tumors. *Clin Cancer Res* 2006;**12(23)**:6946-6951.
52. Engin K, Erişen L. Larenks Kanserleri. İçinde: Çoşkun H., editor. *Baş-Boyun Kanserleri*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2003. pp. 345-384.
53. Busquets JM, Garcia HA, Trinidad-Pinedo J, Baez A. Clinicopathologic characteristics of head and neck squamous cell carcinoma in Puerto Ricans. *P R Health Sci J* 2003;**22(3)**:259-264.
54. Monteiro E, Varzim G, Pires AM, Teixeira M, Lopes C. Cyclin D1 A870G polymorphism and amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: implications of tumor localization and tobacco exposure. *Cancer Detect Prev* 2004;**28(4)**:237-43.
55. Wunsch Filho V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *Sao Paulo Med J* 2004;**122(5)**:188-94.
56. Riboli E, Kaaks R, Esteve J. Nutrition and laryngeal cancer. *Cancer Causes Control* 1996;**7(1)**:147-56.
57. Mendenhall WM, Million RR, Stringer SP, Cassisi NJ. Squamous cell carcinoma of the glottic larynx: a review emphasizing the University of Florida philosophy. *South Med J* 1999;**92(4)**:385-93.
58. Myers EN, Alvi A. Management of carcinoma of the supraglottic larynx: evolution, current concepts, and future trends. *Laryngoscope* 1996;**106(51)**:559-67.
59. Kaya S. Larenksin anatomisi ve fizyolojisi. *Larenks Hastalıkları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2002. pp. 19-75.
60. Engin K, Erişen L. Larenks Kanserleri. İçinde: Çoşkun H., editor. *Baş-Boyun Kanserleri*. İstanbul Nobel Tıp Kitapevleri; 2003. pp. 345-370.

61. Janfaza P, Montgomery WW, Randolph EW. *Baş ve Boyunun Cerrahi Anatomisi*. Cansız H, Yüksel S, editor. İstanbul 2002. pp. 629–674.
62. Sessions RB, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the larynx and hypopharynx. 6 ed. İçinde: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editor. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2001. pp. 861-885.
63. Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoglu G, Kaya S. Prognostic significance of histopathological parameters in cancer of the larynx. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999;**256**(3):139-144.
64. Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B. Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *J Clin Oncol* 2001;**19**(21):4107-4116.
65. Rosai J. Larynx and trachea. 9 ed. *Surgical Pathology*. London 2004. pp. 305-358.
66. Baserer N. Larenks malign neoplazmlarında tedavi. İçinde: O Çelik, editor. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Bas-Boyun Cerrahisi*. İstanbul Turgut Yayıncılık; 2002. pp. 667–683.
67. Cummings W. *Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery* 4ed. Philadelphia Elsevier mosby; 2005. pp. 1823- 1834.
68. Yousem DM, Gad K, Tufano RP. Resectability issues with head and neck cancer. *AJNR Am J Neuroradiol* 2006;**27**(10):2024-2036.
69. Som ML. Conservation surgery for carcinoma of the supraglottis. *J Laryngol Otol* 1970;**84**(7):655-678.
70. Becker M, Zbaren P, Laeng H, Stoupis C, Porcellini B, Vock P. Neoplastic invasion of the laryngeal cartilage: comparison of MR imaging and CT with histopathologic correlation. *Radiology* 1995;**194**(3):661-669.
71. Larynx American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. pp. 41-46.
72. Curran AJ, Irish JC, Gullane PC. Cancer of the larynx, paranasal sinuses and temporal bone. 3 ed. İçinde: Lee KJ, editor. *Essential Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. USA: Appleton and Lange; 1999. pp. 549-572.
73. Piccirillo JF, Lacy PD. Classification and staging of laryngeal cancer. İçinde: Ferlito A, editor. *Disease of larynx*. London: Arnol; 2000. pp. 563-574.
74. Thekdi AA, Ferris RL. Diagnostic assessment of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 2002;**35**(5):953-969.
75. Sagel SS, AufderHeide JF, Aronberg DJ, Stanley RJ, Archer CR. High resolution computed tomography in the staging of carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 1981;**91**(2):292-300.
76. Koybaşıoğlu A, İleri F, Kemaloğlu YK, İnal E, Ataoğlu O, Gungor CT ve ark. Larenks kanserlerinde lenfatik metastaz bölgeleri. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 2000;**38**(2):73-79.
77. Nayar R, Schindler S. Head and neck. İçinde: Haber MH, Gattuso P, Spitz DJ, David O, editors. *Differential diagnosis in surgical pathology*. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 2002. pp. 363- 453.
78. Akman FC, Dag N, Ataman OU, Ecevit C, İkiz AO, Arslan I ve ark. The impact of treatment center on the outcome of patients with laryngeal cancer treated with surgery and radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008;**265**(10):1245-1255.
79. Nix P, Lind M, Greenman J, Stafford N, Cawkwell L. Expression of Cox-2 protein in radioresistant laryngeal cancer. *Ann Oncol* 2004;**15**(5):797-801.

80. Hoffman HT, Buatti J. Update on the endoscopic management of laryngeal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;**12(6)**:525-531.
81. Bardet E, Martin L, Calais G, Alfonsi M, Feham NE, Tuchia C ve ark. Subcutaneous compared with intravenous administration of amifostine in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy: final results of the GORTEC2000-02 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2011;**29(2)**:127-133.
82. Hoffman HT, McCulloch T, Gustin D, Karnell LH. Organ preservation therapy for advanced-stage laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am* 1997;**30(1)**:113-130.
83. Erişen L, Yerci Ö, Yalçınkaya U, Koçer N, Albayram S, Engin K ve ark. Baş-boyun kanserlerinde boyuna yaklaşım. İçinde: Engin K, Erişen L, editor. *Baş Boyun Kanserleri*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2003. pp. 437-502.
84. http://tanpa-pita-suara.blogspot.com.tr/2009_08_01_archive.html; 12.04.2014.
85. Norris JM, Cady B. Larynx and hypofarenx cancer. İçinde: Leibel SA, Phillips T, editor. *Textbook of radiation oncology*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. pp. 412-456.
86. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB ve ark. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2004;**350(19)**:1937-44.
87. Ferlito A, Friedman I, Rinaldo A. Laryngeal epithelial changes, diagnosis and therapy. İçinde: Ferlito A, editor. *Diseases of the larynx*. London: Arnold; 2000. pp. 579-585.
88. Görkey Ş. Kutlay N. *Türkiye Biyoetik Derneği Kök Hücre Araştırmaları ve Uygulamaları Kurulu Kök Hücre Araştırmalarının Etik ve Hukuki Boyutu*. 1 ed. 2009
89. Karagöz E. *Kordon Kanı Kök Hücreleri ve Kordon Kanı Bankacılığı Tarihçesi*. Güneş Tıp Kitabevi; 2007; **20**:325-346.
90. Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs* 2002;**171(1)**:64-76.
91. Avital I, Stojadinovic A, Wang H, Mannion C, Cho WC, Wang J ve ark. Isolation of stem cells using spheroids from fresh surgical specimen: an analytic mini-review. *Cancer Genomics Proteomics* 2014;**11(2)**:57-65.
92. Lotem J, Sachs L. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 2006;**25(59)**:7663-7672.
93. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;**22(4)**:625-634.
94. Gardner RL. Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol* 1983;**24**:63-133.
95. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94(11)**:5709-5712.
96. 29.04.2014.
http://news.bbc.co.uk/2/shared/spl/hi/pop_ups/03/health_stem_cell_guide/html/3.stm
97. McClay DR. Gastrulation. *Curr Opin Genet Dev* 1991;**1(2)**:191-195.
98. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS ve ark. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;**282(5391)**:1145-1147.
99. Liu S, Liu H, Pan Y, Tang S, Xiong J, Hui N ve ark. Human embryonic germ cells isolation from early stages of post-implantation embryos. *Cell Tissue Res* 2004;**318(3)**:525-531.
100. http://www.kokhucredernegei.org.tr/tur/kok_hucre/embriyo.htm; 14.05.2014.

101. Sell S. *Stem cells handbook*. 18 ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2004.
102. Shostak S. Cancer Stem Cells and Cancer Stem Cell Theory. *Cancer Stem Cells-The Cutting Edge*. Croatia: InTech; 2011. pp. 1-133.
103. Slack JM. Origin of stem cells in organogenesis. *Science* 2008;**322**(5907):1498-1501.
104. Mikkers H, Frisen J. Deconstructing stemness. *EMBO J* 2005;**24**(15):2715-2719.
105. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 2000;**287**(5457):1442-1446.
106. <http://physrev.physiology.org/content/physrev/92/1/75/F4.large.jpg>; 28.04.2014.
107. Keller G, Snodgrass HR. Human embryonic stem cells: the future is now. *Nat Med* 1999;**5**(2):151-152.
108. Annas GJ, Caplan A, Elias S. Stem cell politics, ethics and medical progress. *Nat Med* 1999;**5**(12):1339-1341.
109. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 2000;**1**(1):57-64.
110. Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A ve ark. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**(18):6907-6912.
111. Stewart R, Stojkovic M, Lako M. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur J Cancer* 2006;**42**(9):1257-1272.
112. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006;**31**(10):589-595.
113. Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab* 2007;**53**(1-2):81-84.
114. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;**66**(4):1883-90; discussion 95-96.
115. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004;**23**(43):7267-7273.
116. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I ve ark. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res* 2008;**68**(1):190-197.
117. Sharma B, Singh RK. Emerging candidates in breast cancer stem cell maintenance, therapy resistance and relapse. *J Carcinog* 2011;**10**:36.
118. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;**414**(6859):105-111.
119. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP ve ark. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;**122**(6):947-956.
120. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;**194**(4260):23-28.
121. http://stemcells.nih.gov/StaticResources/info/scireport/images/figure9_1.jpg. 30.04.2014.
122. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977;**197**(4302):461-463.
123. Mackillop WJ, Ciampi A, Till JE, Buick RN. A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays. *J Natl Cancer Inst* 1983;**70**(1):9-16.

124. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 2008;**8(10)**:755-768.
125. Alison MR, Islam S, Wright NA. Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J Cell Sci* 2010;**123(14)**:2357-2368.
126. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J ve ark. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;**367(6464)**:645-648.
127. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T ve ark. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;**432(7015)**:396-401.
128. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100(7)**:3983-3988.
129. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW ve ark. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104(24)**:10158-10163.
130. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V ve ark. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;**67(3)**:1030-1037.
131. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;**65(23)**:10946-10951.
132. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S ve ark. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;**121(6)**:823-835.
133. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P ve ark. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104(3)**:973-978.
134. Wei XD, Zhou L, Cheng L, Tian J, Jiang JJ, Maccallum J. In vivo investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Head Neck* 2009;**31(1)**:94-101.
135. Wan G, Zhou L, Xie M, Chen H, Tian J. Characterization of side population cells from laryngeal cancer cell lines. *Head Neck* 2010;**32(10)**:1302-1309.
136. Wu CP, Zhou L, Xie M, Tao L, Zhang M, Tian J. Isolation and in vitro characterization of CD133(+) side population cells from laryngeal cancer cell line. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2011;**46(9)**:752-757.
137. Wu CP, Zhou L, Xie M, Tao L, Zhang M, Tian J. Isolation and in vivo tumorigenicity assay of CD133+ side population cells from laryngeal cancer cell line. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2012;**47(3)**:223-227.
138. Wei XD, He J, Gao JX, Wang JY, Ma BJ, Chen J. Investigation on biological characteristics of CD133+ cancer stem cells in human laryngeal carcinoma Hep-2 cell line. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2013;**48(7)**:578-583.
139. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M ve ark. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;**1(5)**:555-567.
140. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L ve ark. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106(38)**:16281-16286.
141. Dean M. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;**14(1)**:3-9.

142. Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2008;**26(17)**:2839-2845.
143. Facompre N, Nakagawa H, Herlyn M, Basu D. Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas. *Adv Pharmacol* 2012;**65**:235-265.
144. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B ve ark. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007;**11(1)**:69-82.
145. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, Kalisky T, Dorie MJ, Kulp AN ve ark. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature* 2009;**458(7239)**:780-783.
146. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001;**411(6835)**:349-354.
147. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, Chan KW, Guan XY. CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene* 2008;**27(12)**:1749-1758.
148. Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One* 2010;**5(7)**:e11456.
149. Zhong Y, Guan K, Guo S, Zhou C, Wang D, Ma W ve ark. Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 2010;**299(2)**:150-160.
150. Awad O, Yustein JT, Shah P, Gul N, Katuri V, O'Neill A ve ark. High ALDH activity identifies chemotherapy-resistant Ewing's sarcoma stem cells that retain sensitivity to EWS-FLI1 inhibition. *PLoS One* 2010;**5(11)**:e13943.
151. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J ve ark. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;**63(18)**:5821-5828.
152. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U ve ark. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101(39)**:14228-14233.
153. Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, Tanaka F, Mimori K, Barnard GF ve ark. Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells* 2006;**24(3)**:506-513.
154. Goodell MA. Multipotential stem cells and 'side population' cells. *Cytotherapy* 2002;**4(6)**:507-508.
155. Majka SM, Beutz MA, Hagen M, Izzo AA, Voelkel N, Helm KM. Identification of novel resident pulmonary stem cells: form and function of the lung side population. *Stem Cells* 2005;**23(8)**:1073-1081.
156. Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003;**88(4)**:368-378.
157. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol* 2011;**223(2)**:147-161.
158. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA ve ark. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med* 2009;**13(8B)**:2236-2252.
159. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L ve ark. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 2008;**3(6)**:e2428.

160. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;**44**(12):2144-2151.
161. Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *J Pathol* 2008;**214**(1):3-9.
162. HGNC (HUGO Gen Nomenclature Committee)
(http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=9454 30.04.2014.
163. CD133.
(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_Protein?db=coreg=ENS G00000007062r=4:15964699-16086001t=ENST00000505450 30.04.2014.
164. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**(23):12425-12430.
165. Yang JP, Liu Y, Zhong W, Yu D, Wen LJ, Jin CS. Chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in laryngeal carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2011;**124**(7):1055-60.
166. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* 2010;**289**(2):151-160.
167. HGNC (HUGO Gen Nomenclature Committee)
http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=1681; 01.05.2014.
168. CD44.
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=coreg=ENSG00000026508r=11:35160417-35253949t=ENST00000428726 30.04.2014.
169. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H ve ark. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 2011;**19**(3):387-400.
170. de Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, Lacko M, Peutz-Kootstra CJ, de Jong JM ve ark. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res* 2010;**16**(21):5329-5338.
171. Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR. Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 1987;**15**(1):10-17.
172. HGNC (HUGO Gen Nomenclature Committee)
(http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=9454; 02.05.2014.
173. CD34.
(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=coreg=ENSG00000174059r=1:208057594-208084747t=ENST00000356522 02.05.2014.
174. Hadaegh Y, Niknam M, Attar A, Maharlooei MK, Tavangar MS, Aarabi AM ve ark. Characterization of stem cells from the pulp of unerupted third molar tooth. *Indian J Dent Res* 2014;**25**(1):14-21.
175. Clarke C, Titley J, Davies S, O'Hare MJ. An immunomagnetic separation method using superparamagnetic (MACS) beads for large-scale purification of human mammary luminal and myoepithelial cells. *Epithelial Cell Biol* 1994;**3**(1):38-46.
176. Peters CE, Woodside SM, Eaves AC. Isolation of subsets of immune cells. *Methods Mol Biol* 2005;**302**:95-116.
177. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y ve ark. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2009;**16**(12):3488-3498.

178. Cicione C, Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Blanco FJ. Molecular profile and cellular characterization of human bone marrow mesenchymal stem cells: donor influence on chondrogenesis. *Differentiation* 2010;**80(2-3)**:155-165.
179. Pavlidis P, Noble WS. Matrix2png: a utility for visualizing matrix data. *Bioinformatics* 2003;**19(2)**:295-296.
180. Yang C, He X, Song L, Zhan X, Zhang Y, Dou J ve ark. Gamma-Fe₂O₃ nanoparticles increase therapeutic efficacy of combination with paclitaxel and anti-ABCG2 monoclonal antibody on multiple myeloma cancer stem cells in mouse model. *J Biomed Nanotechnol* 2014;**10(2)**:336-344.
181. Chen D, Chen Z, Zhang Y, Park C, Al-Omari A, Moeckel GW. Role of Medullary Progenitor Cells in Epithelial Cell Migration and Proliferation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014.
182. Gong HL, Shi Y, Zhou L, Wu CP, Cao PY, Tao L ve ark. The Composition of Microbiome in Larynx and the Throat Biodiversity between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients and Control Population. *PLoS One* 2013;**8(6)**:e66476.
183. Tominaga S. Major avoidable risk factors of cancer. *Cancer Lett* 1999;**143(1)**:19-23.
184. Burduk PK. Association between infection of virulence cagA gene *Helicobacter pylori* and laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit* 2013;**19**:584-91.
185. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ ve ark. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope* 2006;**116(9)**:1-13.
186. Gourin CG, Conger BT, Sheils WC, Bilodeau PA, Coleman TA, Porubsky ES. The effect of treatment on survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2009;**119(7)**:1312-1317.
187. Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig HH, Schöler J. Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer* 2012;**12**:96.
188. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR ve ark. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006;**5**:67.
189. Zhou L, Wei X, Cheng L, Tian J, Jiang JJ. CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope* 2007;**117(3)**:455-460.
190. Rocco A, Liguori E, Pirozzi G, Tirino V, Compare D, Franco R ve ark. CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors. *J Cell Physiol* 2012;**227(6)**:2686-2693.
191. Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y ve ark. SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *J Mol Cell Biol* 2011;**3(4)**:230-238.
192. Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, Liu C, Lu W. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem* 2010;**285(12)**:9180-9189.
193. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbitt BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 2004;**23(2)**:395-402.
194. Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE ve ark. Increase of GSK3 β messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res* 2000;**60(22)**:6488-6495.

195. Gao L, Yang Y, Xu H, Liu R, Li D, Hong H ve ark. miR-335 functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting OCT4. *Tumour Biol* 2014.
196. de Grouw EP, Raaijmakers MH, Boezeman JB, van der Reijden BA, van de Locht LT, de Witte TJ ve ark. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia* 2006;**20(4)**:750-754.
197. de Jonge-Peeters SD, Kuipers F, de Vries EG, Vellenga E. ABC transporter expression in hematopoietic stem cells and the role in AML drug resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;**62(3)**:214-226.
198. Hong SP, Wen J, Bang S, Park S, Song SY. CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer* 2009;**125(10)**:2323-2331.
199. Li J, Jiang K, Qiu X, Li M, Hao Q, Wei L ve ark. Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *BMB Rep* 2014;**47(1)**:33-38.
200. Luo HN, Wang ZH, Sheng Y, Zhang Q, Yan J, Hou J ve ark. MiR-139 targets CXCR4 and inhibits the proliferation and metastasis of laryngeal squamous carcinoma cells. *Med Oncol* 2014;**31(1)**:789.
201. Mărgăritescu C, Pirici D, Simionescu C, Stepan A. The utility of CD44, CD117 and CD133 in identification of cancer stem cells (CSC) in oral squamous cell carcinomas (OSCC). *Rom J Morphol Embryol* 2011;**52(3)**:985-993.
202. Welte Y, Davies C, Schäfer R, Regenbrecht CR. Patient derived cell culture and isolation of CD133⁺ putative cancer stem cells from melanoma. *J Vis Exp* 2013;**(73)**:e50200.
203. Lawson DA, Witte ON. Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *J Clin Invest* 2007;**117(8)**:2044-2050.
204. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2008;**18(1)**:48-53.
205. Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM. Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* 2008;**49(2)**:193-199.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı :
Konu : 36367

Dahili Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İstanbul / /

04 Ekim 2011

İLGİ: 21.09.2011 tarihli, 9129 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi **Doç.Dr.Mustafa ÖZEN'in** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Bio.İlknur SUER'in** yürütücülüğünde "**Skuamöz hücreli larinks kanser örneklerinden Kanser kök hücresi elde edilmesi ve karakterizasyonu**" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **04 Ekim 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı

Handwritten signature of Prof. Dr. Fatih Altındaş

Not: Yanıtlarda yazınızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İlknur	Soyadı	SUER
Doğ.Yeri	Erzincan-İliç	Doğ.Tar.	20.01.1987
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	
Email	suerilknur@hotmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2014
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2009
Lise	Yabancı Dil Ağırlıklı Kurtuluş Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):