



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI



**LARİNKS KANSERİNİN TANI, RİSK, PROGNOZ ve SAĞ KALIMINDA  
NON-İNVAZİV BİYOBELİRTEÇ OLARAK DOLAŞIMINDAKİ  
mi-RNA-101-3p ve mi-RNA-21-5p’NİN ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Begüm Bahar YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. İrfan PAPİLA  
İSTANBUL – 2020**

**T.C.**  
**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA**  
**CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ**  
**KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**LARİNKS KANSERİNİN TANI, RİSK, PROGNOZ ve SAĞ KALIMINDA**  
**NON-İNVAZİV BİYOBELİRTEÇ OLARAK DOLAŞIMINDAKİ**  
**mi-RNA-101-3p ve mi-RNA-21-5p’NİN ROLÜ**

**KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Begüm Bahar YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Prof. Dr. İrfan PAPİLA**  
**İSTANBUL – 2020**

## ÖNSÖZ

*Cerrahpaşa Tıp fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'na adım attığım ilk günden itibaren benim bugünlere gelmemde emeği çok büyük olan çalışma fırsatı bulduğum ve bulamadığım saygıdeğer hocalarım başta ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Özdoğan, Prof. Dr. Özgün Enver, Prof. Dr. İrfan Devranoğlu, Prof. Dr. İrfan Papila, Prof. Dr. Mehmet Ada, Prof. Dr. Harun Cansız, Prof. Dr. Salih Çanakçıoğlu, Prof. Dr. Özcan Öztürk, Prof. Dr. Fatih Öktem, Prof. Dr. Ender İnci ve Prof. Dr. Ahmet Ataş olmak üzere hepsine,*

*Benim için sadece bir Anabilim Dalı Başkanı değil, hayatımda da oldukça kıymetli bir yere sahip olan, hayatımda aldığım en büyük kararlardan birinin altında imzası olan sayın Prof. Dr. Ahmet Özdoğan'a,*

*Sabriyla, ilgisiyle benim her zaman yanımda olan, kapısını her çaldığımda derdimi sonuna kadar dinleyen, üzüldüğümde beni hep motive eden, bana olan inancını her zaman dile getirerek yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. İrfan Papila'ya,*

*Meslek etiği ve ahlakının anlamını hepimize gösteren, kıymetli tecrübelerinden her zaman faydalandığım ve faydalanacağım, hayatımdaki en unutulmaz anın mimarlarından bir diğeri olan sayın hocam Prof. Dr. Özgün Enver'e*

*Bir baba gibi şefkatini bizlerden esirgemeyen, her ne konuda olursa olsun her zaman yardımcı olacağını bildiğim, her şeyden önce bu meslekle ilgili pek çok şey öğretmiş olan sayın hocam Prof. Dr. Harun Cansız'a,*

*Birlikte çalıştığım için çok şanslı olduğum, elinden çok şey öğrendiğim, yeri geldiğinde her türlü sıkıntımı anlatabildiğim, benden gerçek fikirlerini hiç esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Emin Karaman'a,*

*Kibar ve beyefendi oluşları kadar birbirleri ile olan uyumları, asistan ve öğrencilerine olan ilgili yaklaşımları, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım sayın hocalarım Prof. Dr. Fatih Öktem ve Prof. Dr. Ender İnci'ye,*

*Her zaman yanımızda olan, bir hocadan çok hepimize abilik yapan, herkesin sıkıntısını büyük bir sabırla dinleyen ve çözmek için elinden gelen her şeyi yapan sayın Doç. Dr. H. Murat Yener'e,*

*Mesleki gelişimimde çok büyük payı olan, benim sıkıntılarımı benden önce anlayan, her zaman yanımda olup beni sabırla dinleyen, aklıma ne zaman uçuk kaçık bir düşünce gelse ayaklarımın yere basmasını sağlayan, yeri geldiğinde her şeyi bırakıp bir anne sıcaklığı ile sıklımadan derdimi dinleyip çözüm arayan, fikirlerimi dinleyen ve bu fikirlere ve dolayısı ile bana değer verdiğini hissettiren, zor zamanlarımda omzuna başını koyabilecek kadar yakın olduğum sayın Doç. Dr. Ayşegül Batıoğlu Karaaltın'a,*

*Her ne olursa olsun yüzündeki gülümsemeyi eksik etmeyen, ağabeyliği ile her zaman yanımda olan, birlikte çalışma fırsatım olduğu için kendimi şanslı saydığım, hem abim hem de hocam olan sayın Doç. Dr. Mehmet Yılmaz'a*

*Asistanlığa başladığımda birlikte refakat nöbeti tuttuğum, şu anda başasistanım olan, başım sıkıştığında yardımını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi E. Deniz Gözen'e*

*Tezimin hazırlanmasında çok büyük emeği olan, elinden gelen tüm imkanlarla bana her aşamada yardımcı olan ve bu tez sayesinde tanıştığım için kendimi şanslı saydığım sayın hocam Prof. Dr. Hafize Uzun'a ve asistanı Araş. Gör. Sinem Durmuş'a teşekkürü bir borç bilirim.*

*Birlikte çalıştığım her anından keyif aldığım, her birisi benim için birer kardeş gibi olan, acı tatlı her şeyi paylaştığım, iyi günlerde birlikte sevindiğim, kötü günlerde birbirimize kenetlendiğimiz, gece gündüz demeden, en ağır koşullarda çalışırken bile gülüp eğlenbildiğim, asistanlığımın zor anlarını keyifli kılan tüm asistan arkadaşlarıma, beyefendiği için Dr. Fırat Tevetoğlu'na, son bir buçuk yıl sağ kolum olan Dr. Türkan Guliyev'e, beni hep güldürmeyi başaran Dr. Çınare Aliyeva'ya, nöbetler hiç bitmesin dedirten Dr. Sinem Kara'ya, yaramaz küçük kardeşim Dr. Hüseyin Yusufli'ye, çalışma özverisi ve dikkatiyle Dr. Rafet Yıldırım'a ve ekibimize yeni katılan Dr. Taha Elkhatroushi ve Dr. Gamze Çifti'ye ayrıca teşekkür etmek isterim.*

*Her an omuz omuza çalıştığım, birlikte pek çok zor an geçirdiğim, maddi manevi her türlü desteği esirgemeyen servis hemşirelerimize, ameliyathanede bizim için ellerinden gelen tüm çabayı sarf eden ameliyathane hemşirelerimize, poliklinikte hep yardımımıza koşan, bizi koruyup kollayan poliklinik hemşirelerime, birlikte çalışmaktan hep keyif aldığım tüm personel, laboratuvar, radyoloji çalışanlarımızın her birine çok teşekkür ederim.*

*Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, hayatımın önemli tüm anlarında yanımda olan, her zaman benim iyiliğimi istediğini bildiğim canım abim Op. Dr. Nihat Kaya'ya,*

*Beni bugünlere getiren, her ne yaparsam yapayım arkamda olacaklarını bildiğim, onlara hissettiğim minnetin birkaç kelimeye sığmayacağı annem Umay Başoğlu ve babam Kenan Başoğlu'na benim için yapmış oldukları, vaz geçmiş oldukları her şey için teşekkür ederim. Her türlü sıkıntımızda yanımızda olan, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kayıvalidem Canan Yılmaz'a ve kayınpederim A. Zeki Yılmaz'a da çok teşekkür ederim.*

*Bu klinik bana pek çok şey kazandırdı ama hepsinden önemlisi eşimi kazandırdı. Pek çok kişinin elde edemeyeceği bir fırsat ile elinden pek çok vaka öğrendiğim, hayatımda ve meslek hayatımda en büyük yeri olan, hayat arkadaşım, sırdaşım, beni benden iyi tanıyan, benim için her türlü fedakarlığı yapan, bu hayatta en çok güvendiğim, her zaman arkamda olduğunu bildiğim, eşi olduğum için gurur duyduğum, eşim Dr. Öğr. Üyesi Yetkin Zeki Yılmaz'a çok teşekkür ederim.*

*Dr. Begüm Bahar Yılmaz*

*İstanbul, 2020*

# İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| ÖNSÖZ.....  | i    |
| İÇİNDEKİLER.....  | iv   |
| KISALTMALAR.....  | vi   |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                     | x    |
| TABLolar LİSTESİ.....                                     | xi   |
| ÖZET.....   | xiii |
| ABSTRACT.....   | xiv  |
| 1. GİRİŞ.....   | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                    | 3    |
| 2.1. LARENKS EMBRİYOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ..... | 3    |
| 2.1.1. LARENKS EMBRİYOLOJİSİ.....                         | 3    |
| 2.1.2. LARENKS ANATOMİSİ.....                             | 4    |
| 2.1.3. LARENKS HİSTOLOJİSİ.....                           | 11   |
| 2.2. LARENKS KANSERİ.....                                 | 12   |
| 2.2.1. EPİDEMİYOLOJİ.....                                 | 12   |
| 2.2.2. RİSK FAKTÖRLERİ.....                               | 12   |
| 2.2.3. LARENKS SCC PATOLOJİSİ .....                       | 15   |
| 2.2.4. LARENKS SCC KLİNİĞİ ve TANISI.....                 | 18   |
| 2.2.5. LARENKS SCC TNM EVRELEMESİ.....                    | 24   |
| 2.2.6. LARENKS SCC TEDAVİSİ.....                          | 34   |
| 2.2.6.1. GLOTTİK SCC TEDAVİSİ.....                        | 35   |
| 2.2.6.2. SUPRAGLOTTİK SCC TEDAVİSİ.....                   | 41   |
| 2.2.6.3. SUBGLOTTİK SCC TEDAVİSİ.....                     | 48   |
| 2.2.7. LARENKS SCC'DE PROGNOZ, PROGNOSTİK FAKTÖRLER.....  | 48   |
| 2.2.8. LARENKS SCC'DE TEDAVİ SONRASI TAKİP.....           | 51   |
| 2.3. MİKRO-RNA GENEL BİLGİLER.....                        | 52   |
| 2.3.1. miRNA'LARIN KARSİNOGENEZDEKİ ROLÜ.....             | 66   |
| 2.3.2. miRNA-21'İN KANSERDEKİ ROLÜ.....                   | 68   |
| 2.3.3. miRNA-101'İN KANSERDEKİ ROLÜ.....                  | 71   |
| 2.3.4. LARENKS SCC'DE MİKRO-RNA EKSPRESYONLARI.....       | 75   |
| 2.3.4.1. LARENKS SCC'DE miRNA-21.....                     | 78   |
| 2.3.4.2. LARENKS SCC'DE miRNA-101.....                    | 79   |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| <b>3.</b> | <b>GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                | <b>82</b>  |
|           | <b>3.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI.....</b>   | <b>82</b>  |
|           | <b>3.2. HASTA VE KONTROL GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ.....</b>  | <b>82</b>  |
|           | <b>3.3. ÖRNEK TOPLAMA VE ANALİZLENEN PARAMETRELER.....</b> | <b>83</b>  |
|           | <b>3.4. MİKRO-RNA ANALİZİ.....</b>                         | <b>83</b>  |
|           | <b>3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....</b>                      | <b>83</b>  |
|           | <b>3.6. HASTALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....</b>              | <b>84</b>  |
| <b>4.</b> | <b>BULGULAR.....</b>                                       | <b>85</b>  |
| <b>5.</b> | <b>TARTIŞMA.....</b>                                       | <b>94</b>  |
| <b>6.</b> | <b>SONUÇ.....</b>  | <b>100</b> |
|           | <b>KAYNAKÇA.....</b>                                       | <b>101</b> |



## KISALTMALAR

LSCC: Larenks skuamoz hücreli karsinomu

RNA: Ribonükleik asit

miR: Mikro ribonükleik asit

miRNA: Mikro ribonükleik asit

TNM: Tümör/Lenf nodu/Metastaz

PEA: Preepiglottik alan

PGA: Paraglottik alan

SGA: Subglottik alan

RLS: Rekürren larengeal sinir

SCC: Skuamoz hücreli karsinom

LPR: Larinofaringeal reflü

HPV: Human papilloma virüs

IHC: İmmünohisto kimya

PEH: Psödoepiteliomatous hiperplazisi

GCT: Dev hücreli tümör

BT: Bilgisayarlı tomografi

MR: Manyetik rezonans

PET: Pozitron emisyon tomografi

FDG: Fluorodeoxyglukoz

USG: Ultrason görüntüleme

İİAB: İnce iğne aspirasyon biyopsi

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ENİ: Ekstranodal invazyon

ENİK: Klinik ekstranodal invazyon

kN: Klinik lenf nodu evrelemesi

pN: Patolojik lenf nodu evrelemesi

RT: Radyoterapi

KRT: Kemoradyoterapi

VHL: Vertikal hemilarenjektomi

TLM: Transoral lazer mikrocerrahi

SKPL: Suprakrikoid parsiyel larenjektomi

SGPL: Supaglottik parsiyel larenjektomi



TORC: Transoral robotik cerrahi  
KHP: Krikohyoidopeksi  
EGFR: Epidermal growth faktör reseptörü  
COX-2: Cyclooxygenase-2  
mRNA: mesajcı RNA  
nt: Nükleotid  
UTR: Untranslasyon bölgesi  
stRNA: küçük geçici RNA  
hnRNA: Heteronükleer RNA  
snoRNA: küçük nükleolar RNA  
snRNA: küçük nükleer RNA  
tRNA: Translasyonel RNA  
RNAi: RNA interferas  
RISC: RNA indüklenen susturma kompleksi  
PTSG: Post-translasyonel gen susturma  
siRNA: Küçük RNA  
miRNP: miRNA ribonükleoprotein kompleksi  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
KLL: Kronik lenfositik lenfoma  
AGTR1: Anjiotensin II tip 1 reseptörü  
MAPK: mitojenle aktive edilmiş protein kinaz yolu  
IL: İnterlökin  
Spry1: Sprouty homolog 1  
PDCD4: hücre ölümünü koruyan protein 4  
TGF-b: Transforming büyüme faktörü-b  
GC: Gastrik kanser  
CC: Kolanjiokarsinom  
OS: Osteosarkom  
HCC: Hepatoselüler karsinom  
KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu  
OSCC: Oral skuamoz hücreli karsinom  
BTCC: Mesanenin transiyent hücreli karsinomu  
IPMN: İntraduktal papiller müsin neoplazmı  
MSA: Multi sistem atrofisi

HPS: Hepatopulmoner sendrom  
KF: Kistik Fibrozis  
GDM: Gestasyonel diyabetes mellitus  
EZH2: Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressif Kompleks 2 Subuniti  
eRMS: Embriyonel Rabdomiyosarkom  
PcG: Polycomb grubu  
WT1: Willm's tümörü baskılayıcı gen 1  
Rap1b: Ras ile ilişkili protein-1b  
DNMT3A: DNA metiltransferaz 3A  
POMP: Proteazom olgunlaşma proteini  
PTC: Papiller tiroid karsinomu  
PCa: Prostat kanseri  
Jak2: Janus kinaz 2  
EYA1: Eyes absent homolog 1  
SOX2: Cinsiyet belirleme bölgesi Y-box-2  
HIF1a: Hipoksi ile indüklenbilir faktör 1a  
VHL: Von Hippel Lindau  
RLIP76: Ral bağlama proteini 1  
PDA: Pankreas adenoduktal karsinom  
RRM1: Ribonükleotit redüktaz M1  
VEGF-C: Vasküler endotelyal growth faktör-C  
DNA-PKcs: DNA bağımlı protein kinaz katalitik alt ünitesi  
AP-1: Aktivatör protein-1  
TF: Transkripsiyon faktörü  
EOC: Epitelyal over kanseri  
HIF: Hipoksi ile indüklenen faktör  
CERS6: Seramid sentaz 6  
ZEB1: Çinko parmak E-kutu bağlayıcı homeobox 1  
EMT: Epitelyal mezenşimal geçiş  
USP22: Uniquitin'e özgü proteaz 22  
CXCR7: CX kemokin reseptörü 7  
SOX9: Cinsiyet belirleme bölgesi Y-box-9  
GBM: Glioblastoma multiforme  
CRC: Kolorektal kanser

GSK3  $\beta$ : Glikojen sentaz kinaz 3  
ITGA3: İntegrin subunit alfa 3  
HNSCC: Baş boyun skuamoz hücreli karsinomu  
FZD4: Frizzled-4  
PTEN: Fosfataz tensin homolog geni  
TP53: Tümör protein p53  
AMO: anti-miRNA oligonükleotid  
p-Akt: Fosforile-Akt  
Mcl-1: Miyeloid cell leukemia-1  
Pol: Polimeraz  
CDK-8: Siklin bağımlı kinaz-8  
MED12: Mediator kompleks subunit 12  
Hep-2: İnsan epitel tip 2

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1: Larenksin intrinsik ligamanları ve preepiglottik boşluk .....6
- Şekil 2: Konus elasticusun yerleşimi, paraglottik ve subglottik boşluklar.....8
- Şekil 3: Glottik bölgede vokal ligament ve tiroaritenoid kasların yerleşimi.....10
- Şekil 4: miRNA biyogenez adımları.....57
- Şekil 5: Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla miR-21 ve miR-101'in kat değişim grafiği. 90
- Şekil 6: Serum miR-21 ve miR-101 ekspresyonunun ROC eğrisi analizi.....90

## TABLolar LİSTESİ

|  |    |
|--|----|
| Tablo 1: Larenksin İnternal Kasları ve Vokal Kord Hareketlerine Etkileri.....                            | 9  |
| Tablo 2: Larenksten kaynaklanabilecek maligniteler.....  | 16 |
| Tablo 3: Skuamoz hücreli kanserde histolojik grade.....  | 17 |
| Tablo 4: Supraglottik tümörlerin T evrelemesi.....   | 29 |
| Tablo 5: Glottik tümörlerin T evrelemesi.....  | 30 |
| Tablo 6: Subglottik tümörlerin T evrelemesi.....   | 31 |
| Tablo 7: Klinik Lenf Nodu (kN) Evrelemesi.....   | 32 |
| Tablo 8: Patolojik Lenf Nodu (pN) Evrelemesi.....  | 33 |
| Tablo 9: Metastaz Evrelemesi (M).....  | 34 |
| Tablo 10: AJCC Prognostik Evre Grupları.....   | 34 |
| Tablo 11: Açık Supraglottik Parsiyel Larenjektomi Kontraendikasyonları.....                              | 42 |
| Tablo 12: İleri Evre Supraglottik SCC’de SKPL Endikasyon ve Kontraendikasyonları.....                    | 46 |
| Tablo 13: Larenks SCC’de Prognostik Faktörler.....   | 49 |
| Tablo 14: Hastaların demografik özellikleri.....   | 85 |
| Tablo 15: Hasta grubu klinik özellikleri ve TNM evrelemeleri.....  | 86 |
| Tablo 16: Hastaların ileri patolojik değerleri.....  | 88 |
| Tablo 17: Hasta ve kontrol grubunun miR-21 ve miR-101 ekspresyon düzeyleri ve kat değişim değerleri..... | 89 |
| Tablo 18: Serum miR-21 ve miR-101 ekspresyonunun ROC eğrisi analizi ve kesim değerleri....               | 91 |

|   |    |
|---|----|
| Tablo 19: Sigara ve Alkol Kullanımı ile Larenks SCC Gelişmesi Risk Analizi Sonuçları.....     | 91 |
| Tablo 20: Demografik veriler ile miRNA ekspresyonları arasında korelasyon verileri.....       | 92 |
| Tablo 21: Klinik veriler ile miR-21 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon verileri.....  | 92 |
| Tablo 22: Klinik veriler ile miR-101 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon verileri..... | 93 |



## ÖZET

Larenks kanseri, dünya çapında en sık görülen ikinci baş boyun skuamöz hücreli karsinomudur. Türkiye'de en sık görülen ikinci malignitedir ve erkeklerde ölümün %7'sinden sorumludur. Doğru tedavinin seçilebilmesi için doğru histopatolojik tanı konması, primer tümörün yayılımının doğru bir şekilde tespit edilmesi ve doğru TNM evrelemesi yapılması şarttır.

Son yıllarda moleküler biyolojinin en önemli keşiflerinden biri miRNA'lardır. Son on yılda, miRNA'lar hedef mRNA'larının ekspresyonunu kontrol ederek tümör büyümesi, invazyon, anjiyogenez ve immun yanıtta büyük öneme sahip oldukları gösterilmiştir. Larenks kanserinin moleküler mekanizmaları hala açıklanamamıştır. miRNA'ların LSCC tanısı için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak amacıyla bu çalışma tasarlanmıştır.

Çalışmaya LSCC nedeniyle tanı almış 46 hasta ve kontrol grubu olarak 30 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Hasta ve kontrol bireylerin miR-21 ekspresyon düzeyleri ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Hasta grubunda miR-21'in 1,708 kat up regüle olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun miR-101 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Hasta grubunda miR-101'in 0,675 kat down-regüle olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca miR-101'in kesim değerinden büyük olması durumunda hastalık riskini 5,20 kat arttırdığı bulunmuştur.

Hasta grubunda miR-21 ekspresyon düzeyleri ile klinik T, klinik Evre, patolojik T, patolojik evre, lenfatik invazyon ve kartilaj invazyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon bulunmuştur. Hasta grubunda miR-101 ve miR-21 ekspresyonu ile patolojik N arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon bulunmuştur.

Klinik ve patolojik veriler arasında miR-21 ve miR-101 değerleri arasında bulunan korelasyonlar, bu mikroRNA'ların LSCC'de prognostik bir önemi olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bu mikroRNA'lardan miR-21'in hasta grubunda önemli ölçüde artmış oluşu yeni bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak mikroRNA'ların kanser gelişiminde önemli bir role sahip oldukları fakat çalışmaların daha büyük hasta gruplarında yapılması ile sonuçların doğrulanması gerekmektedir.

## ABSTRACT

Larynx squamous cell carcinoma is the second most common head and neck cancer worldwide. It's the second most common cancer in Turkey and it's responsible 7% of the cancer related deaths. In order to select the right treatment, correct histopathological diagnosis, correct staging and detection of primary tumor spread are essential.

microRNAs are one of the most important discoveries in molecular biology. In the last decade, miRNAs have been shown to be of major importance in tumor growth, invasion, angiogenesis and immune response by controlling the expression of target mRNAs. The molecular mechanisms of laryngeal cancer are still unexplained. This study was designed to investigate whether miRNAs can be used as potential biomarkers and prognostic factors for LSCC.

46 patients diagnosed with LSCC and 30 healthy volunteers were included in this study. There was a statistically significant difference between the mean expression levels of miR-21 in patients and control subjects. In the patient group, miR-21 was regulated up to 1,708 times. There was a statistically significant difference between miR-101 expression levels of the patient and control groups. MiR-101 was 0.675 times down-regulated in the patient group. It was also found that if miR-101 is greater than the cut-off value, it increases the disease risk by 5.20 times.

There was a statistically significant weak positive correlation between miR-21 expression levels and clinical T, clinical stage, pathological T, pathological stage, lymphatic invasion and cartilage invasion in the patient group. There was a statistically significant weak positive correlation between miR-101 and miR-21 expression and pathological N in the patient group.

Correlations between miR-21 and miR-101 values between clinical and pathological data indicate that these microRNAs have a prognostic significance in LSCC. At the same time, a significant increase in miR-21 of these microRNAs in the patient group suggests that it may be a new therapeutic target. In conclusion, microRNAs have an important role in the development of cancer but the studies need to be confirmed in larger patient groups.



# 1. GİRİŞ

Larenks skuamoz hücreli karsinomu (LSCC), baş boyun kanserleri içerisinde önemli yer tutan bir hasta grubudur. Teknoloji ve görüntüleme yöntemlerinin hızla gelişmesi ile hastalar günümüzde daha erken tanı almaktadır. Bunların yanında yeni geliştirilen tedavi metodları da hastaların sağ kalımında ilerleme sağladığı gibi hastalığa bağlı morbiditeleri de azaltmayı amaçlamaktadır.

Yeni geliştirilen cerrahi yöntemler, tümör eksizyonunu sağlam sınırlar ile sağlayıp eş zamanlı olarak kalan Larenksin fonksiyonel olarak korunmasını sağlar. Cerrahi istemeyen veya cerrahiye uygun olmayan adaylar için organ koruyucu radyoterapi veya kemoradyoterapi tedavi seçenekleri de mevcuttur.

Günümüzde tanı ve tedavi yöntemlerinde her ne kadar ilerleme sağlanmış olsa da benzer hastaların prognozlarının farklı oluşu altta yatan başka mekanizmalar olduğunu düşündürmektedir. Bu sebepleri ortaya çıkarmak için bir çok çalışma yapılmış olup aradaki farkı yaratan sebepler henüz tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

Tümör genetiği ve biyokimyası ile yapılmış olan pek çok çalışma mevcuttur. Son on yılda bu çalışmalar içerisinde öne çıkan biyobelirteçlerden bir tanesi de mikro ribonükleik asitlerdir (mikroRNA). Protein kodlamayan küçük RNA sınıfında yer alan mikroRNA'ların hücre işleyişini ve hücreler arası iletişimi düzenlemede son derece önemli rol oynayan bir alt grup oldukları oldukça dikkat çekmektedir.

Gerek hücre siklusu, gerek anjiogenezde düzenleyici olarak rol oynayan pek çok mikroRNA olduğu belirlenmiş olup bu mikroRNA'ların tümörogenezde de anahtar rol oynayabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Literatürde yapılan pek çok araştırmada mikroRNA-21'in pek çok tümör patogenezinde rol oynayan bir mikroRNA olduğu tespit edilmiş olup gelecekte tedavi hedeflerinden biri olabileceği öne sürülmektedir. Bunun yanında mikroRNA-101 ise tam tersi olarak hücre gelişimini baskılayarak tümör gelişimini inhibe edebileceği görüşü mevcuttur.

Larenks skuamoz hücreli karsinomu ile ilgili yapılan çalışmaların pek çoğunda mikroRNA-21 değerlendirilmiş ve önemli bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür. mikroRNA-101 ve larenks skuamoz hücreli karsinomu ile ilgili yapılan çalışmalar ise kısıtlıdır.

Bu amaçla larenks kanseri gelişiminde önemli olabileceğini düşünmekte olduğumuz bu yeni biyobelirteçlerin önemini araştırmak açısından hasta kanlarında bu yeni biyobelirteçleri ve bunların klinik önemini değerlendirmek açısından bu çalışma dizayn edilmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. LARENKS EMBRİYOLOJİSİ, ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

Larenks, musköloligamentöz ve kartilajinöz yapılardan oluşur. Boyunda servikal 3 ve 6. vertebralar hizasında, trakea üstünde yer almaktadır. Larenksin birincil işlevi, alt solunum yolu için koruyucu bir sfinkter görevi görmektir. Larenksin ikincil ve önemli bir rolü, fonasyon organı olarak hareket etmektedir.

Larenks klinik olarak supraglottis (vokal kordlara kraniyal), glottis (vokal kordlar) ve subglottis (vokal kordlara kaudal) olarak üç alana bölünmüştür. Subglottis krikoid kıkırdak alt sınırındaki trakea ile devam eder.

#### 2.1.1 LARENKS EMBRİYOLOJİSİ

Trakeobronşiyal oluk, larenks, trakea, bronşlar ve akciğerleri içeren solunum yolunun öncülüdür. Foregut (ön bağırsak) ventromedian divertikülünden, farengeal poşların kaudalinden gelişir. Solunum divertikülünün her iki tarafında lateral oluklar gelişir ve bu durum giderek derinleşir ve nihayetinde larengotrakeal tüpü oluşturmak için birleşir. Bu tüpün kraniyal ucundan (hipobronşiyal çıkıntının hemen arkasından ve 4. ve 6. dal arkları arasından) ilkel larengeal aditus veya yarık gelişir<sup>1</sup>.

Larengotrakeal oluğun kenarları, özefagusu larengotrakeal oluktan ayıran, trakeo-özofageal septumu oluşturmak için kaudokraniyal yönde birleşir. İntrauterin hayatın beşinci haftasında larenks, üç primer doku kitlesinden oluşur: anteriorda, hipobronşiyal eminens (2. ve 4. brankiyal arkus) ve lateralde yer alan iki mezenşimal aditus ve larenksin primer aritenoid kıkırdaklarını oluşturacak doku kabarıntıları (6. brankiyal arkın ventral uçları). Altıncı haftaya kadar, üç primer doku kitlesi büyür, dil köküne doğru hareket eder ve T şeklinde bir larengeal aditus oluşur<sup>2</sup>.

İntrauterin 11-12. haftalarda larenks ana topografisi oluşur ve kondrifikasyon (kıkırdaklaşma) başlar. İkinci trimesterin sonunda ön hyoid kemiği tiroid kıkırdağının üst sınırını kaplar ve bu pozisyon yaşamın ilk yılının sonuna kadar devam eder. Ek olarak, fetal larenks (1) çeneye karşı geniş bir açıda ve (2) yetişkin bir gırtlakla (C3-C6) karşılaştırıldığında, boyunda servikal 1-2. vertebra hizasında daha yükseğe yerleşmiştir. Nispeten daha kraniyal pozisyon, doğum sonrası dönemde, solunum ile ses çıkarma ve yutmanın eş zamanlı

yapılabilmesini sağlar. Doğumdan sonraki 6 yıl boyunca, larenks, bireye daha geniş bir ses aralığı aralığı (daha geniş supraglottik farenks nedeniyle) sağlamak için yetişkin pozisyonuna iner ama bu iniş larenksin eşzamanlı yutma ve nefes alma fonksiyonunu kaybetmesine sebep olur<sup>3</sup>.

Larengeal kaslar, 4. ve 6. brankiyal arkların mezenşiminden gelişir. Bu nedenle, tüm laringeal kaslar vagus sinirinin dalları tarafından inerve olur: Süperior laringeal sinir, 4. brankiyal ark kaynaklı yapıları ve rekürren laringeal sinir, 6. brankiyal ark kaynaklı yapıları inerve eder<sup>3</sup>.

### **2.1.2. LARENKS ANATOMİSİ**

Larenks, mukozal bir yüzey, kıkırdak, bağlar, kaslar ve eklemler içeren kompozit bir organdır. Tek olan üç adet kıkırdak; tiroid, krikoid ve epiglot ve üç çift kıkırdak; aritenoid, kornikülat ve kuneiform kartilajlar vardır. Ligamentler; eksternal (tirohiyoid membran, krikotiroid, hyoepiglottik ve tiroepiglottik ligamentler) ve internal (kuadrangüler membran) ve conus elastikus (krikovokal ligaman) olarak bölünmüştür. Vokal kordun esas ligamanı olan vokal ligaman conus elasticusun kranial kısmıdır.

Larenksin üstün sınırı, epiglotun üst ucu ve lateral kenarından ve ariyeepiglottik foldların üst kenarından oluşur. Anterosuperior sınır, suprahyoid epiglotun lingual yüzeyi ve preepiglottik boşluğun üst sınırını oluşturan hyoepiglottik ligament tarafından oluşturulur. Larenksin ön sınırı, supraglottisteki tirohiyoid membran ve tiroid kıkırdak, glottisteki tiroid kıkırdak ve subglottisteki krikoid kıkırdak ön arkı ve krikorioid membrandan oluşur. Larenksin inferior limiti, krikoid kıkırdağın inferior kenarından geçen yatay düzlem ile tanımlanır. Larenksin arka ve lateral sınırları, ariyeepiglottik kıvrımların laringeal yüzeyinden, ariteno kıkırdaklarından, interarytenoid alandan ve krikoid kıkırdak yüzeyini kaplayan mukoza olarak tanımlanan subglottik alanın arka yüzeyinden oluşur.

Larenks girişinin açıklığı kraniale ve dorsale doğrudur ve epiglot, ariyeepiglottik foldlar ve interaritenoid fissür ile sınırlıdır. Larengeal girişin aşağısında vestibuler foldlar (yalancı vokal kordlar) ve vestibül bulunur. Vestibüler foldlar ve gerçek vokal kordlar arasında larenks ventrikülü veya bir diğer adı ile larengeal sinüs yer alır. Lateral sinüsün ventralinde yer alan açıklığa larengeal sakkül denir. Larengeal sakkül müköz membranın oluşturduğu bir poştur ve vestibuler fold ve tiroid laminaya doğru ventrale bir kaç milimetre uzanım gösterir.

Her iki vokal kord arasındaki açıklığa rima glottis adı verilir. Rima glottisin ön %60'lık kısmını vokal kordlar yapar ve intermembranöz kısım olarak adlandırılır, arka %40'lık kısmı ise aritenoid kartilajların vokal processleri ile yapılır ve interkartilajinöz kısım olarak adlandırılır.

Larenksin kraniyalinde hyoid kemik yerleşmiştir. Hyoid kemik suprahoid kaslar ve dil kasları ile asılıdır.

Tiroid kıkırdak, sırasıyla üst ve alt boynuzları olarak kraniyal ve kaudal olarak çıkıntı yapan serbest posterior kenarları olan iki lamina içerir. Bu iki lamina orta hatta birleşir. Her bir inferior boynuz, krikoid kıkırdak (krikotiroid eklemi) ile eklem yapar. Bu eklem cerrahi olarak önemlidir, çünkü rekürren larengeal sinirin larenks içine girerken konumunu belirlemek için palpe edilebilir. Anterior olarak, laminanın birleşim yeri larengeal çıkıntıyı (Adem elması) ve orta hatta tiroid çentiği oluşturur. Krikoid kartilaj, tek, halka şeklinde bir kartilajdır. Hem tiroid hem de aritenoid kartilajlarla sinoviyal eklemler yapar ve solunum yolunun tek tam kartilaj halkasıdır.

Epiglotik kıkırdak kavisli bir yaprak şeklindedir; kaudal olarak, ince bir uzantı (petiol) ile tiroid kıkırdağının iç yüzeyine (tiroid çentiğinin altında), tiroepiglotik ligament tarafından tutunur. Bu yerleştirmeden sonra, epiglotik kıkırdak larenks vestibülünü bir kapak gibi kapatır. Sırasıyla hyoepiglottik ve tiroepiglotik ligamentler ile hyoid kemiğin arka yüzeyine ve tiroid kıkırdağına tutunur. Ariyepiglotik müköz membran kıvrımları epiglotu lateral olarak aritenoid kıkırdaklarına bağlar. Median glosso-epiglotik kıvrım epiglotu dilin tabanına tutturur ve lateral glossoepiglotik kıvrımlar epiglotu farenkse bağlar.

Aritenoid kıkırdaklar, krikoid kıkırdak üst yüzeyinde yer alan oluklara oturur ve krikoaritenoid eklemi yapar. Üstünde yer alan uzantılara vokal ligamanlar ve çeşitli gırtlak kasları tutunur. Piramit şeklindedirler ancak tabanlarında vokal kordun bağlanacağı bir ön çıkıntı (vokal process) ve krikoadaryenoid kaslar için bir yan uzantı (musküler process) bulunur. Aritenoid'in superior process, arilepiglotik fold içerisindeki corniculate kıkırdak ile eklem yapar. Aryepiglottik foldun daha ilerisinde kuneiform kartilajlar bulunur<sup>4</sup>.

### **Larenksin Ekstrinsik Ligamanları**

Tiroid membran, hyoid kemik ile tiroid kıkırdak arasında uzanır. Uzanımı boyunca bazı bölgelerde kalınlaşır. Bu kalınlaşmalardan birincisi orta hatta, median tirohyoid ligaman diğeri

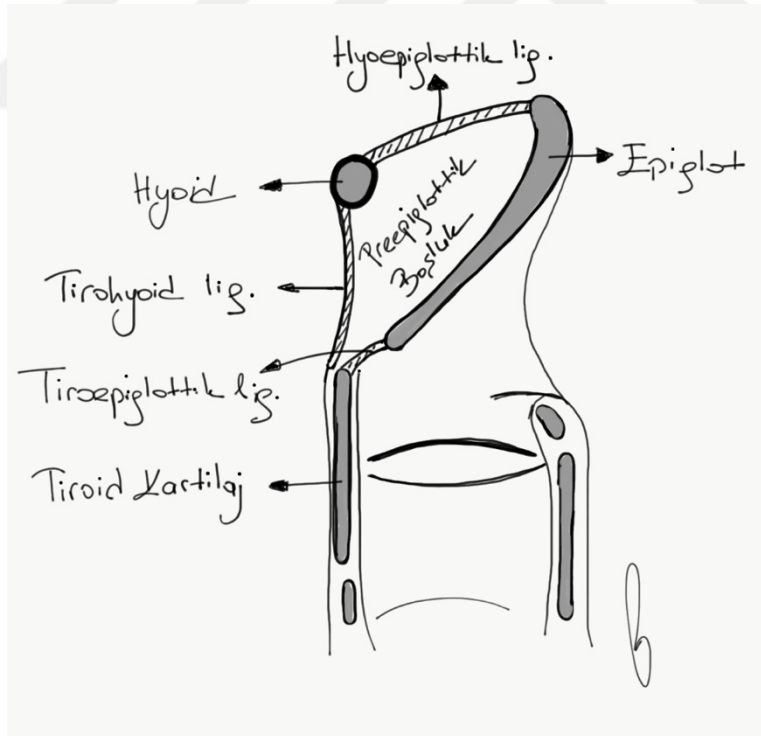
dorsalde, lateral tirohyoid ligamanları oluşturur. Bu son ligamentlerin her ikisi de küçük birer tritiseal kıkırdak içerir.

Tirohyoid membran, piriform resesin lateral sınırını oluşturur ve superior laringeal sinirin internal dalı ve süperior laringeal arter ve ven bu membranı perfore ederek larenkse girer. Pre-epiglottik boşluk, tirohyoid membranın arkasında kalır.

Krikotiroid ligament, krikoidi tiroid kıkırdağa bağlar: Derin parçası kriko-vokal membran (conus elasticus) olarak adlandırılır<sup>5</sup>.

### Larenksin İntrinsik Ligamanları

Kuadrangüler membran, aritenoid kartilajlardan başlayıp epiglota kadar uzanır. Üst ucu epiglotun alt yarımına tutunur. Arka sınırı aritenoid kartilajlardan kornikülat kartilajlara kadardır. Kraniyal sınırı, larenks girişi içerisinde ve aryepiglottik foldları oluşturur. Kaudal sınırı ise serbesttir ve yalancı vokal kordları oluşturur.



Şekil 1: Larenksin intrinsik ligamanları ve preepiglottik boşluk

Krikotiroid ligament, conus elastikus olarak da bilinen median krikotiroid ligamenti oluşturmak için orta hatta kalınlaşır. Daha önemli olan lateral kısım bol miktarda elastik lif içerir ve buna lateral krikotiroid membran, triangüler membran veya kriko-vokal membran denir (Şekil 2). Krikoid kıkırdak arkından krankal olarak, tiroid kıkırdak lamellerinin birleşme noktası arasında uzanır. Dorsal olarak, aritenoid kıkırdağının vokal processine bağlanır. Kranial sınır serbest, kalınlaşmış ve mukoza zarı ile kaplanmıştır. Bu, krikovokal ligament veya vokal ligamenttir (vokal kord)<sup>5</sup>(Şekil 3).

## **Larenksin Bölümleri<sup>6</sup>**

Larenks üç bölgeye ayrılmıştır: supraglottis, glottis ve subglottis. Bu bölünme, larenksin embriyolojik yapısını ve larengeal kanserin yayılmasındaki anatomik engelleri yansıtmaktadır. Tümör/lenf nodu /metastaz (TNM) evreleme sistemi, T evresini tanımlamak için kullanılan larenksin supraglottisini ve glottisini daha da alt gruplara böler. Suprahyoid ve infrahyoid epiglot arasındaki sınır, hyoid kemiğinden geçen hayali yatay bir düzlemdir. Bu ayrılma önemlidir, çünkü infrahyoid epiglot, preepiglotik alan (PEA) ile anterior olarak iletişim kurar, oysa suprahyoid epiglott bu alanla ilişkide değildir. Supraglottisin aşağı sınırı, gerçek vokal kordun üst yüzeyi ile birleştiğinde ventrikülün lateral kenarından geçen yatay bir düzlemdir. Glottis, gerçek vokal kordların hem üst hem de alt yüzeylerini ve ön ve arka komissürleri içerir. Glottisin inferior sınırı, vokal kordun üstün yüzeyi ile ventrikülün lateral sınırı ile birleştiği yer olarak tanımlanan supraglottisin inferior sınırından 1 cm aşağı horizontal bir düzlemdir. Subglottis, glottisin alt sınırından krikoid kıkırdağın alt kenarına kadar uzanır; herhangi bir alt gruba daha fazla bölünmemiştir.<sup>7</sup>

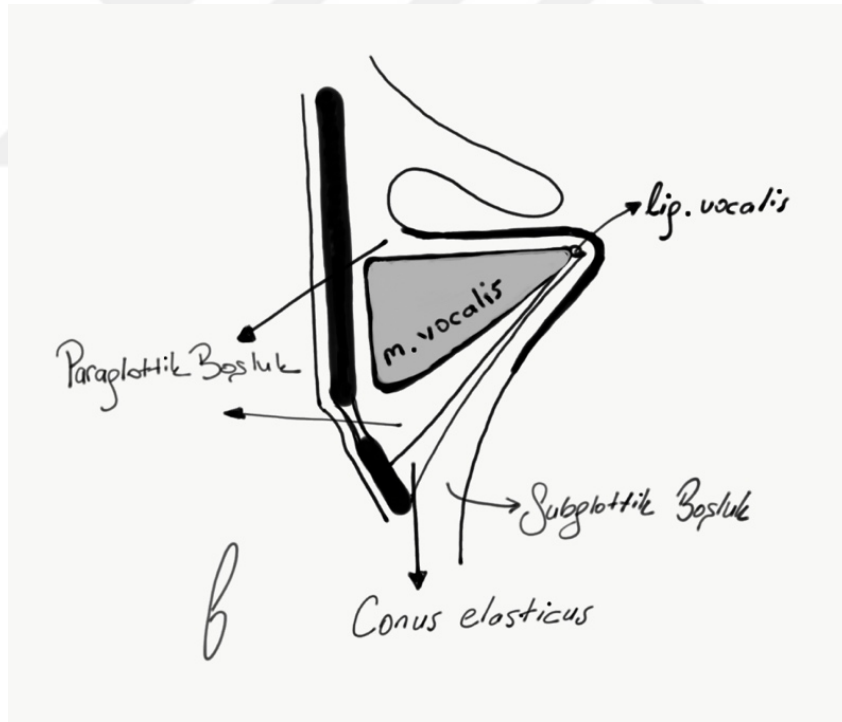
Larenksin intrinsik ve ekstrinsik ligamentlerinin oluşturduğu larengeal alanlar klinik açıdan özellikle larengeal kanserin yayılma yollarını ön görmek açısından oldukça önemlidir. Bunlar;

- Pre-epiglottik alan (PEA): Sınırları anteriorda, tiroid kıkırdak ve tirohiyoid membrandır; süperiorda, hyoid, hyoepiglotik ligament ve vallekülalar; ve posterior olarak, epiglot ve tiroepiglotik ligamanın ön yüzeyidir. Lateralde, PEA iki paraglottik alanlar ile devam etmektedir. PEA, yağ ve bağ dokusu<sup>8</sup> içerir ve sıklıkla tümörler tarafından invaze edilir, çünkü epiglotta infrahyoid epiglottan kaynaklanan kanserlerin geçebileceği çok sayıda küçük fenestrasyona sahiptir. süperior olarak, hyoepiglotik ligament, tümörün dil köküne yayılması için bir engel sağlar. PEA'nın lenfatikleri,

tirohiyoid membrandan drene olur ve en başta seviye II ve III olmak üzere boynun her iki tarafındaki lenf nodlarına yayılır<sup>9</sup>. Yağlı doku içerir (Şekil 1).

- Paraglottik alan (PGA): PGA, gerçek ve yanlış vokal foldlara lateral olarak uzanır ve tiroid kıkırdağına lateral olarak uzanır. Her PGA'nın sınırları medial olarak (süperiordan inferiora doğru), kuadrangüler membran, larengeal ventrikül ve konus elastikus; lateral olarak, atienoid, tiroid kıkırdak önü ve piriform sinüsün medial duvarının mukozasını posterior olarak; ve inferolateral olarak, kriktiroid membranı içerir<sup>10</sup> (Şekil 2).
- Subglottik alan (SGA): Süperiorda vokal kord ve süperolateralda konus elasticus ile sınırlıdır (Şekil 2).

Larengeal kıkırdaklar, hyoepiglotik ligament, tirohiyoid membran, kuadrangüler membran, konus elastikus, anterior komissür ve krikoroid membran tümörün yayılmasına karşı doğal bariyerler oluşturur. Larenks içerisinde, PEA ve PGA, larengeal tümörlerin yayılması için yollar sağlar.



**Şekil 2: Konus elasticusun yerleşimi, paraglottik ve subglottik boşluklar**



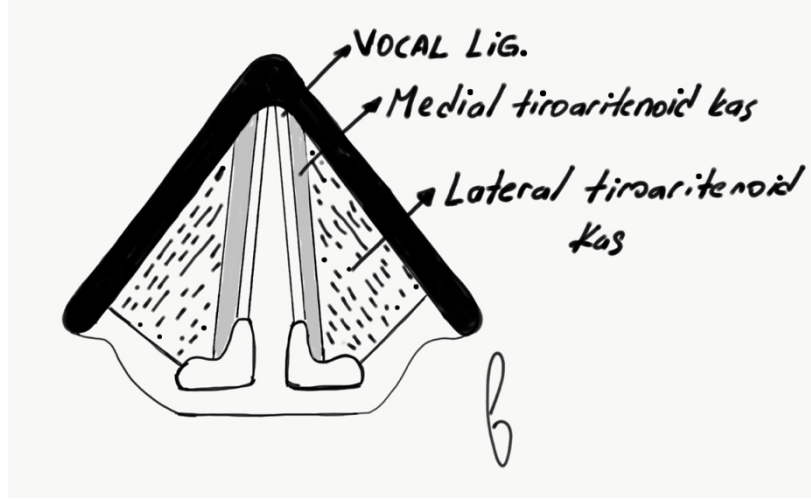
## Larenksin İnternal Kasları

İntrinsik kaslar, kasılması halinde larengeal açıklığın boyut ve şeklini değiştiren ve vokal kordları hareket ettiren kaslardır. Bu kaslar sırası ile; aryeepiglottik kaslar, oblik aritenoid kaslar ve tiroepiglottik kaslardır.

Vokal kord hareketlerinden sorumlu olan kaslar addüktör ve abdüktör kaslar olmak üzere ikiye ayrılır. Abdüksiyondan sorumlu olan kas grubu posterior krikoaritenoid kastır. Bu kasa karşıt olarak iki tane addüktör kas bulunur; lateral krikoaritenoid ve transvers aritenoid kaslar. Vokal kord boyunda uzamayı sağlayan kas krikotiroid kastır ve bu kasın karşıtı tiroaritenoid kastır (Şekil 3). Vokal kordun uzunluğu ve gerginliğinde olan değişimler sesin frekansını azaltıp artırır, internal kaslar ve vokal kord hareketlerine olan etkileri Tablo 1’de özetlenmiştir<sup>4</sup>.

**Tablo 1: Larenksin İnternal Kasları ve Vokal Kord Hareketlerine Etkileri**

| VOKAL KORDLARA ETKİ                       |                   |         |          |         |                  |
|---|-------------------|---------|----------|---------|------------------|
|   | HAREKET           | BOY     | KALINLIK | GERİLİM | SERBEST<br>KENAR |
| Posterior krikoaritenoid kas (m.posticus) | <u>Abdüksiyon</u> | -       | -        | -       | -                |
| İnternal tiroaritenoid kas (m.vocalis)    | Addüksiyon        | Kısalma | Artar    | Artar   | Yuvarlaklaşır    |
| Krikotiroid kas                           | Addüksiyon        | Uzama   | Azalı    | Artar   | Keskinleşir      |
| Lateral krikoaritenoid kas                | Addüksiyon        | Kısalma | Artar    | -       | Yuvarlaklaşma    |
| İnteraritenoid kas (transver ve oblik)    | Addüksiyon        | -       | -        | -       | -                |



**Şekil 3: Glottik bölgede vokal ligament ve tiroaritenoid kasların yerleşimi**

### **Larenksin Eksternal Kasları**

Eksternal kaslar larenksi kraniale veya kaudale doğru hareket ettirir. Eleve eden kaslar; tirohyoid, stylopharyngeus, palatopharyngeus, salphingopharyngeus ve inferior constrictor kaslardır. Hyoidi eleve ederek larenkste indirek elevasyona sebep olan kaslar; mylohyoid, digastrik, stylohyoid ve geniohyoid kaslardır. Larenksi direk olarak inferior yönde hareket ettiren kas sternothyroid kasıdır. Sternohyoid ve omohyoid kaslar hyoid kemiği kaudale deprese ederek larenksin indirek olarak aşağıya hareket etmesini sağlar. Eksternal kaslar yutma esnasında ve solunumda aksesuar kaslar olarak önemli işlevlere sahiptir<sup>4</sup>.

### **Larenksin Damarları ve Lenfatik Drenajı**

Süperior larengeal arter (eksternal karotis arterin dalı olan süperior tiroid arterin dalı) ve inferior larengeal arter (inferior tiroid arterin dalı) larenksin arteriyal beslenmesini sağlar ve birbirleri ile anastamoz yaparlar. İnférieur tiroid arter tiroservikal trunkusun dalıdır, tiroservikal trunkus subclavian arterin ilk kısmından kaynaklanır<sup>11</sup>.

Süperior laringeal arter piriform resese, internal laringeal sinir ile birlikte tirohyoid membranı delerek girer ve asendan ve desendan dallarına ayrılır.

Larenksin venöz drenajı süperior ve inferior laringeal venlere olur. Süperior larengeal ven, arteri ile birlikte seyrederek süperior tiroid vene dökülür. İnférieur tiroid ven de buna benzer şekilde inferior tiroid vene oradan da brakiosefalik vene dökülür.

Supraglottik damarlar vokal proses, anterior komissür ve aryepiglottik foldun epiglottik yapışma bölgesi arasında kalan üçgen alandan çıkar<sup>12</sup>.

Larenksin üst ve alt yarımının drenajı sırasıyla süperior (omohyoid kasın kraniyaline) ve inferior servikal lenf nodlarına drene olur. Ek olarak bazı lenfatikler larengeal (Delphian) veya pre-trakeal lenf nodlarına drene olur. Vokal kordlar lenfatiklerden fakirdir<sup>13</sup>.

### **Larenksin İnnervasyonu**

Larenksin tüm intrinsik kasları krikotiroid kas hariç rekürren larengeal sinir (RLS) ile innerve olur. Krikotiroid kas inervasyonunu süperior larengeal sinirin eksternal dalı sağlar. Rekürren larengeal sinir krikotiroid eklemin arkasından larenkse girer, sıklıkla iki dala ayrılır; anterior dal addüktör, posterior dal abduktördür<sup>14</sup>.

Larenksin müköz membranlarının duyusunu, vokal kordların üstünde süperior larengeal sinirin internal dalı, altında ise rekürren larengeal sinir alır. İnternal larengeal sinir tirohyoid membrandan iki veya üç dala ayrılmış olarak girer. Semptatik uyarım süperior ve middle servikal semptatik daldan gelir ve arterler ile birlikte seyrederek.

### **2.1.3. LARENKS HİSTOLOJİSİ**

Histolojik olarak vestibuler foldların üstünde kalan alan goblet hücreli pseudostrafiyepitelyal silyalı kolumnar epitel ile kaplıdır. Altındaki lamina propiada değişken sayıda seröz ve müköz glandlar bulunur ve bu glandların salgılayıcı duktusları epitel yüzeyine açılır.

Ventrikül bölgesinde epitel değişir, ventriküler foldları kaplayan solunum epiteli, vokal kord düzeyinde çok katlı yassı epitele dönüşür. Larengeal ventrikül bölgesinin lamina propriası hyalin tiroid kartilaj perikondriumuna karışır. Belirgin bir submukozal alan izlenmez.

Vokal kordlar kalın çok katlı yassı epitel ile döşelidir. Bu epitelin fonksiyonu kordların hızlı hareketlerinden dolayı mukozada oluşabilecek bir hasarı engellemektir. Vokal kord epiteli altında yer alan subepitelyal bağ dokusu 3 kata ayrılır. süperfiyal lamina propiada az miktarda elastik veya kollajen lifler bulunur, bu sayede hareket kabiliyeti fazladır. Intermediate lamina propria elastik ve kollajenöz liflerden zengindir, anterior ve posterior kısımlarda yoğunlaşır. Derin lamina propiada kollajen lifler daha yoğundur. İntermediate ve derin lamina propiada

yerleşmiş olan kollajen lifler vokal ligamanı oluşturur. Derin lamina proprianın altında iskelet kas olan vokalis kası yer alır ve en içteki kas lifleri vokal kord yapısına katkıda bulunur<sup>6</sup>.

## **2.2. LARENKS KANSERİ**

Larenksin en sık görülen malign tümörü yassı hücreli karsinom bir diğer adıyla skuamöz hücreli karsinom(SCC) ve tüm larenks malignitelerinin % 85-95'idir<sup>15,16</sup>. Bu tümör çok katlı yassı epitelden veya skuamöz metaplazi gösteren solunum epitelinden kaynaklanır. Larenksin her üç bölgesinden (supraglottis, glottis ve subglottis) kaynaklanan SCC insidansı hasta popülasyonuna göre değişir. Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, İngiltere ve İsveç'te glottik SCC, supraglottik SCC'den daha yaygındır; bunun tam tersi Fransa, İtalya, İspanya, Finlandiya ve Hollanda'da doğrudur. Japonya'da, glottik ve supraglottik SCC benzer insidans oranlarına sahiptir ve primer subglottik SCC tüm popülasyonlarda nadir görülür<sup>15</sup>. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 160.000 larenks kanseri vakalarının büyük bir incelemesinde,%51 glottis, %33 supraglottis ve %2 subglottis, % 14 kategorize edilemeyen olarak gruplanmıştır<sup>17</sup>.

### **2.2.1. EPİDEMİYOLOJİ**

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2007 yılında yaklaşık 11.300 larenks kanser vakası teşhis edildi ve bunların da yaklaşık 3660 ölümle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir. Larenks kanseri için erkek-kadın insidansı oranı 3.8:1'dir<sup>18</sup>, ve ırksal bir farklılık yoktur<sup>19</sup>. Epidemiyoloji ve risk faktörleri genel olarak baş ve boyun kanseri için olanlara paraleldir; Kanserlerin% 90'ından fazlası 40 yaşın üzerindeki kişilerde görülür ve bu kanserlerin% 85-95'i SCC'dir. Erkeklerde görülme sıklığı, cinsiyete bağlı bir farklılıktan ziyade risk faktörlerine maruziyetin daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, kadın sigara içenlerin sayısı son 60 yılda arttığı için, aradaki fark 15: 1'den yaklaşık 4: 1'e düşmüştür. Türkiye'de en sık görülen ikinci malignitedir ve erkeklerde ölümün %7'sinden sorumludur<sup>20</sup>.

### **2.2.2. RİSK FAKTÖRLERİ**

Larenks kanseri etyolojisinde en önemli risk faktörü tütün ve alkol kullanımı olup, literatürde larengofarengal reflü, Human Papilloma Virüs, çeşitli toksinler suçlanmıştır. Bunların dışında kişiye bağlı genetik ve ailesel faktörler ve kişinin beslenmesinin de kanser gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir.

## - Tütün ve Alkol

Tütün ve alkol kullanımı, larenks kanseri için iki ana risk faktörüdür. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, baş ve boyun kanseri gelişimi ile tütün ve alkol kullanımı arasında nedensel bir bağlantı olduğunu belirtmek için kanıtların yeterli olduğu sonucuna varmıştır. Risk, tütün veya alkol tüketiminin yoğunluğu ve süresi ile orantılıdır ve kullanımın bırakılmasından sonra risk yavaş yavaş azalır, ancak 20 yıl sonra bile bazal düzeyine geri dönmez. Tütün maruziyetinin (örneğin, puroya karşı sigara, filtreden geçirilmiş sigaralara karşı filtrelenmiş sigaralar) türünde risk farklılıkları vardır, ancak en önemli faktörler tüketilen tütün miktarı ve maruz kalma süresidir. Tütün ve alkol, kanser riskini arttırmak için sinerjik olarak hareket eder<sup>21-23</sup>. Alkol tüketimi supraglottik karsinom için daha önemli bir risk faktörü iken, tütün kullanımı glottik karsinom ile güçlü bir şekilde ilişkilidir.

## -Larengofarengeal reflü

Larenksin kronik tahrişi, larenks kanseri için bir risk faktörü olarak önerilmiştir ve sigara içmeyen veya içmeyenler için katkıda bulunan bir faktör olabilir 1980'lerde laringofarengeal reflü (LPR) asidinin kansere neden olabileceği endişesi artmıştır<sup>24,25</sup>. İlişkinin nedensel mi yoksa sadece bir tesadüf mü olduğunu belirlemek zordur. ABD gazilerinin değerlendirildiği büyük bir vaka kontrol çalışması, tütün ve alkol kullanımına bağlı olarak gelişen LPR'ye bağlı larengal veya farengal kanser için riskin orta derecede arttığı sonucuna varmıştır. LPR karsinojen bir risk faktörü olup olmadığı konusu net değildir<sup>26</sup>. Alkali safra reflüsü de etken olabilir. Bir çalışmada, gastrektomi yapılan hastalarda kontrollere kıyasla, larenks karsinomu görülme sıklığı anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur<sup>27</sup>.

## - Human papilloma virüs (HPV)

Human papilloma virüsü (HPV), uzun zamandan beri kadınlarda rahim ağzı kanseri için bir etken faktör olarak kabul edilmiştir ve güncel yayınlarda orofaringeal SCC'ye neden olduğu bilinmektedir<sup>28</sup>. HPV ve diğer baş ve boyun SCC alt tipleri arasındaki ilişki iyi kurulmamıştır. Yakın tarihli bir sistematik literatür taramasında, larengal SCC'nin HPV DNA varlığı açısından incelendiği ve yayınların HPV DNA'sının ağırlıklı prevalansını bulduğunu belirten 41 yayın mevcuttur. 1,712 larengal SCC vakasında HPV DNA oranı ortalama % 23,6 olarak tespit edilmiştir. Bu, orofarenks SCC'de HPV DNA'sının prevalansından biraz daha yüksektir<sup>29</sup>. Larenks SCC'de HPV durumu ile arasında ilişki bulunamamıştır<sup>30-34</sup>. Bununla

birlikte, HPV enfeksiyonu ile larenks SCC riski arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Larenks SCC'de pek çok HPV alt tipi izole edilmiş olmasına rağmen, HPV 16 en sık tanımlanmış alt tiptir.

#### - Diğer Toksinler

Toksinlere mesleki olarak maruz kalınması larengeal kanser için başka bir risk faktörüdür. Larenks kanseri insidansı, hem yüksek alkol hem de tütün alımı oranlarının yüksek olduğu ve orantısız potansiyel toksin seviyelerine maruz kalan vasıfsız el işçilerinde daha yüksektir<sup>35-37</sup>. Çok sayıda ajan larenks kanseri için risk faktörü olarak gösterilmiştir; bunlara dizel egzozu, asbest, organik çözücüler, sülfürik asit, hardal gazı, bazı mineral yağlar, metal tozu, asfalt, odun tozu, taş tozu, mineral yün ve çimento tozu dahildir. Asbest maruziyetinin önemi tartışmalıdır. 1999 yılında yayınlanan bir meta-analiz, asbest maruziyeti ve larengeal kanser arasında zayıf bir ilişki olduğu sonucuna varmıştır<sup>38</sup>. Herhangi bir toksin ile larenks kanseri arasında bir bağlantı kurmak zordur, çünkü yapılan pek çok çalışmada başka faktörler karıştırıcı sonuçlara sebep olmaktadır<sup>39</sup>.

#### - Genetik ve Ailesel Faktörler

Sigara içen çoğu kişi tütün kullanımının bir sonucu olarak erken ölüm riski ile karşı karşıyadır, ancak sigara içen bireylerin çok az bir kısmında kanser gelişir. Kansere karşı genetik duyarlılık, diğer kanserlerin yanı sıra tüm baş ve boyun kanserlerinin gelişimi için bariz bir risk faktörüdür, ancak riskler açıkça tanımlanmamıştır. Epidemiyolojik çalışmalarda, baş boyun kanseri ve diğer kanserlerin gelişimini arttıran ve kanser gelişimiyle ilişkili moleküler değişiklikleri belirlemek için biyobelirteçler geliştirilme aşamasındadır. Bu analizler kansere karşı genetik duyarlılık için belirteçlerin tespitini sağlar (örneğin, mutajen duyarlılığı) ve tedaviye cevap konusunda prognostik bilgi sağlama potansiyeline sahiptir<sup>40</sup>. Faz I ve faz II detoksifiye edici enzimlerin polimorfizmleri, ayrıca DNA onarım enzimlerinin polimorfizmi de baş boyun kanseri gelişme riski ile ilişkilendirilmiştir.. Bu çalışmalar kanser patogenezi anlamak için faydalıdır, ancak şu anda bireysel hastaları yöneten klinisyene rehberlik etmek için yardım sağlamamaktadır.

Ailesel kanser sendromlarının keşfedilmesi, kanser oluşumunda genetik duyarlılığın rolüne dikkat çekmiştir<sup>41</sup>. Ailesel sendromların (örneğin, xeroderma pigmentosum) çok az bir kısmında baş boyun kanseri riskinde artış olduğu tespit edilmiştir; ancak baş boyun kanserli

hastaların aile bireylerinde yüksek risk olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Copper ve meslektaşları<sup>42</sup>, kanser hastalarının kardeşlerinde solunum yolu kanserleri için göreceli olarak 14.6 ve birinci derece akrabalar için genel olarak göreceli 3,5 risk artışı tespit etmiştir. Kanserojenlere maruz kalmayı tolere etme kabiliyeti oldukça değişkendir ve prokarsinojenlerin aktivasyonunu önleme, aktif kanserojenleri etkisizleştirme, DNA hasarını onarma ve immün sürveyansını sürdürme yeteneği ile ilgilidir. Bu faktörler bireyler arasında oldukça değişkendir ve hala tam olarak anlaşılamamıştır.

#### - Beslenme

Kanıtlar diyet faktörlerini baş ve boyun kanseri riski ile ilişkilendirmektedir<sup>43,44</sup>. Meyve ve sebze alımının artması, et ve yağ alımının azalması koruyucu etkiye sahiptir ve baş ve boyun kanseri, kolon kanseri ve kardiyovasküler hastalık insidansının azalması ile ilişkilidir. Bununla birlikte, bu faydaların ortaya çıkması 20 yıl veya daha uzun sürebilir ve şu anda bu epidemiyolojik gözlemlerin kanser gelişimine olan etkisini değerlendirmek için yeterli kanıt bulunmamaktadır<sup>45,46</sup>.

### **2.2.3. LARENKS SCC PATOLOJİSİ**

Larenks epitel, kas, lenfatik ve kan damarları, kartilaj içeren kompozit bir organdır ve teorik olarak bu dokuların herhangi birinden kanser gelişebilir. Larenks maligniteleri içindeki en önemli grup yüzey epitelinden kaynaklanan skuamoz hücreli karsinomdur. Kesin tanı yalnızca patoloji ile konabilir. Larenksten kaynaklanabilecek kanserler Tablo 2'de listelenmiştir.

**Tablo 2: Larenksten kaynaklanabilecek maligniteler<sup>47</sup>**

| Kaynaklandığı Doku            | Kanser Türü   |
|-------------------------------|---|
| Epitel                        | Skuamöz hücreli karsinom<br>Verrüköz karsinom<br>Bazaloid skuamöz hücreli karsinom<br>Spindle hücreli karsinom (Sarkomatoid karsinom)<br>Adenoskuamöz hücreli karsinom<br>Akantolitik skuamöz hücreli karsinom<br>Papiller skuamöz hücreli karsinom |
| Minör tükürük bezi            | Mukoepidermoid karsinom<br>Adenoid kistik karsinom  |
| Nöroendokrin hücreler         | Tipik karsinoid tümör<br>Atipik karsinoid tümör<br>Küçük hücreli nöroendokrin karsinom<br>Paraganglioma   |
| Yumuşak doku, kemik, kartilaj | Kondrosarkom<br>Malign fibröz histiyositoma<br>Liposarkom<br>Kaposi sarkomu   |
| Hematolenfoid                 | Ekstramedüller plazmositom<br>Lenfoma   |
| Melanosit                     | Mukozal malign melanom  |
| Diğer                         | İnflamatuvar miyofibroblastik tümör<br>Dev hücreli tümör  |

Skvamöz diferansiyasyon, keratin oluşumu ve/veya hücreler arası köprülerin varlığı SCC tanısı için gerekli patolojik değerlendirme kriterleridir<sup>48</sup>. SCC histolojik görünümüne göre sınıflandırılır ve üç sınıfa ayrılır (Tablo 3)<sup>7</sup>. İyi diferansiye SCC normal yassı hücreli epitele benzer, bazal-tip hücreler ve keratinizasyon içeren yassı hücreli epitel ve interselüler köprüler içerir, çekirdek hiperkromatik, irregüler sayı ve yapıdadır, polimorfizm içerir, çekirdek/sitoplazma oranı azalmıştır ve atipik mitozlar nadirdir. Orta diferansiye SCC daha az keratinizasyon içerir, atipik mitoz daha fazladır ve daha fazla nükleer polimorfizm izlenir, interselüler köprüler mevcuttur. Az diferansiye SCC’de keratinizasyon çok azdır, interselüler



köprü yapıları azalmıştır ve atipik mitoz fazla görülür<sup>16,48</sup>. Histolojik derecenin prognostik değere sahip olduğu bildirilmiştir; ancak, derecelendirme öznel ve örnekleme hatası çok sıktır.

**Tablo 3: Skuamoz hücreli kanserde histolojik grade**

| Grade | Grade açıklaması          | Gradeleme tanımı   |
|-------|---------------------------|--|
| Gx    | Grade değerlendirilemiyor |  |
| G1    | İyi diferansiye           | Normal skuamoz epitele benzer, büyük, farklılaşmış, keratinosit benzeri hücreler ve küçük bazal tip hücreler<br>İnterselüler köprüler ve tam keratinizasyon mevcut<br>Atipik mitoz nadir |
| G2    | Orta diferansiye          | Daha fazla nükleer polimorfizm mevcut<br>Atipik mitoz mevcut<br>Değişik derecede keratinizasyon  |
| G3    | Kötü diferansiye          | Bazal tip hücreler dominant<br>Atipik mitozlar sık<br>Güçlkle tanımlanabilen interselüler köprüler<br>Minimal keratinizasyon veya keratinizasyon yok                                     |

SCC epitel bazal membranı geçerek altta yatan dokuya invaze olur. Tümör ve çevre normal doku arasındaki ilişki invazyon paternine göre farklılık gösterir. İnvazyon belirgin itilmiş sınırlar şeklinde olan ekspansil karakterde olabilir veya çevre doku ile belirgin sınırların izlenmediği infiltratif paternde olabilir. İnfiltratif patern kötü prognoz ile ilişkilidir<sup>49</sup>. Tüm epitel katmanlarının karsinom değişikliği gösterdiği fakat alttaki stromada belirgin invazyon görülmediği durumlar in-situ SCC olarak adlandırılır. Mikroinvaziv SCC tanımı ise invazyonun bazal membran derinine sınırlı olduğu durumları tarif eder<sup>48</sup>.

SCC, sitokeratin ve epitelyal membran antijeni gibi epitelyal biyobelirteçleri eksprese eder<sup>16</sup>. Bu belirteçler, SCC ile benzer histolojik görünüme sahip malign tümörleri ayırt etmek için kullanılan immünohistokimya (IHC) ile tespit edilir.

SCC'nin patolojik tanısı genellikle basittir; bununla birlikte, özellikle iki durum SCC'den ayırt etmek zor olabilir. İlk, psödoepiteliomatous hiperplazisi (PEH), histolojik olarak

karsinomu taklit eden skuamöz epitel büyümesiyle karakterizedir. Kronik irritasyon, travma, enfeksiyon veya dev hücreli tümör (GCT) ile ilişkili primer bir süreç veya sekonder histolojik bulgu olabilir. Epitelde sitolojik olarak malignite bulguları gözlenmez; bununla birlikte, kesit alınan kısım epitel hiperplazisine teğar olarak kesildiğinde invazyonu taklit edebilir. Doğru yönlendirilmiş örnekler ve dikkatli inceleme genellikle psödoepiteliyomatöz hiperplaziyi SCC'den mak mümkündür, ancak immün boyama aradaki farkı ayırt etmede yardımcı olabilir<sup>48,50</sup>. İkinci durum nekrotizan sialometaplazi, tükürük dokusunun enfarktı sonucu olduğu düşünülmektedir. Larenkste oldukça nadir görülür, ancak birkaç vaka bildirilmiştir<sup>51</sup>. İskemi veya travmadan sonra larenkste gelişebilir ve SCC veya mukopidermoid ile karışabilen serömüköz bezlerinin kanal ve asinilerinin skuamöz metaplazisi ile karışabilir. Bu lezyon kendiliğinden düzelir. Nekrotizan sialometaplaziyi SCC'den ve mukoepidermoid karsinomdan, nöroendokrin karsinom, malign melanom veya lenfoma gibi bazı non-epitelyal maligniteleri ayırt etmek için IHC gerekebilir; bunlar histolojik olarak incelendiğinde benzer bir görünüme sahip olabilir<sup>48,52</sup>.

#### **2.2.4. LARENKS SCC KLİNİĞİ ve TANISI**

Larenks SCC'nin semptomları primer tümörün köken aldığı bölgeye göre değişir. Glottik SCC'nin asıl semptomu, disfonidir, çünkü ses telinin normal titreşim özellikleri küçük bir lezyon tarafından bile değişir. Bu nedenle, glottik SCC'li hastalar genellikle hastalığın erken evrelerinde tıbbi yardım alır, ancak erken semptomlar görmezden gelinir veya yanlış tanılarına atfedilirse, dispne ve stridor gibi hastalığın ileri evresinde görülen semptomlar ortaya çıkabilir. Glottik tümörler tümör yayılımına karşı doğal bariyerlerin (ligamentler, membranlar ve kıkırdaklar) olması ve glottik lenfatiklerin göreceli az olması nedeniyle glottiste uzun süre lokalize kalmaya meyillidir.

Supraglottik tümörler, disfoniye neden olabilir ve ayrıca disfaji, odinofaji, otalji, stridor, dispne ve hemoptiziye neden olabilir. Supraglottik SCC'li hastalar başlangıçta bariz laringofaringeal semptomları olmadan servikal lenf nodu metastazı ile hekime başvurabilir. Supraglottik kanserler, obstrüktif semptomlara neden olacak kadar büyüyebilir ve bu noktada, zengin lenfatikler vasıtasıyla her iki servikal lenf nodu grubuna da yayılırlar.

Subglottisin SCC'si sıklıkla ileri evrede tanı alır ve dispne ve stridor, subglottik SCC'nin en sık görülen semptomlarıdır. Başlangıcı genellikle aşamalı ve sinsi olduğundan, subglottik SCC astım veya başka bir akciğer hastalığı olarak yanlış teşhis edilebilir<sup>53,54</sup>.

Larenksin endoskopik muayenesinde, SCC ülseratif, egzofitik, sapsız veya polipoid lezyon olarak görülebilir. Bununla birlikte, nadir görülen ventrikülosaküler SCC vakalarında, erken evrelerde epitelyal bir lezyon görülemeyebilir, çünkü karsinom paraglottik boşluk içinde kalan ventrikülosaküler sistemden kaynaklanır<sup>55</sup>. Bu senaryoda, malignite tanısını doğrulamak veya dışlamak için vestibüler bölgeden derin biyopsiler gerekir. Gizli larenks SCC'nin altta yatan etiyoloji olabileceği ikinci bir klinik durum da laringosel ile ilgilidir. Laringosellerle SCC arasındaki ilişki bilinen bir durumdur<sup>18</sup>. Laringoselli hastalarda ventrikülün SCC'sini dışlamak için açılı endoskoplar kullanarak ventrikülün dikkatli muayenesi ile doğrudan laringoskopi yapılması şarttır.

Larenks SCC'de servikal lenf nodu metastazlarının ve ilgili lenf nodu gruplarının insidansı primer tümörün bölgesine göre değişir. Zengin lenfatik ağı nedeniyle, supraglottik SCC, klinik olarak belirgin ve gizli metastazlarda en yüksek bölgesel metastaz insidansına sahiptir. Supraglottik lezyonların servikal lenf nodu metastazları T1'in% 10'u, T2'nin% 29'u, T3'ün% 38'i ve T4 %57'sinde görülmektedir<sup>56-59</sup>. Supraglottik lezyonlarda klinik bulgu vermeyen, gizli lenf nodu metastaz insidansı, T evresi daha ileri olan tümörlerde daha yüksektir: T1 tümörler için % 0 -% 14; T2 için,%20-21, T3 için % 28-35 ve T4 lezyonları için % 40-75'tir<sup>57,60</sup>. Supraglottik SCC genellikle II, III ve IV boyun seviyelerine metastaz yapar. I ve V boyun seviyelerine nadirdir ve bu bölgelerde metastaz varsa diğer lenf nodlarına çoktan metastaz yapmış olma ihtimalleri fazladır. N0 ve N1 boynun cerrahi tedavisi genellikle iki taraflı boyun seviyeleri II'den IV'e kadar selektif boyun diseksiyonu ile yapılır. N2 veya N3 hastalığı için seviye I'den V'e uzanan kapsamlı bir boyun diseksiyonu gerekebilir.

Glottik SCC'nin servikal lenf nodu metastaz riski düşüktür: 910 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, patolojik olarak doğrulanmış lenf nodu metastazı görülme sıklığı% 5.9, okült metastaz görülme oranı % 18 olarak hesaplanmıştır<sup>61</sup>. Bölgesel lenf nodu metastaz riski supraglottik tümörlerde de olduğu gibi T evresi ile ilişkilidir. Aynı seride lenf nodu metastaz oranı T1'in % 0.1'inde (sadece bir hasta), T2'nin% 5'inde, T3'ün% 18'inde ve T4 tümörlerinin% 32'sinde tespit edilmiştir<sup>61</sup>. Glottik tümörlerde riskli olan lenf nodu grupları II, III, IV ve VI seviyeleri - prelarengal, paratrakeal ve pretrakeal lenf nodlarıdır. Bilateral veya kontralateral metastazlar nadirdir.

Primer subglottik karsinomlar nadir görülür ve bu tümörlerin klinik davranışlarının tanımları az sayıda hastadan elde edilmiş klinik bilgilere dayanır. Paratrakeal lenf nodları (seviye VI) en sık olarak tutulur, kontralateral veya bilateral metastazlar sıktır. III, IV ve V

boyun seviyelerine metastaz nadirdir. Bu tümörlerin agresif olması ve kötü prognoza sahip olmalarına rağmen, servikal metastaz insidansının genellikle düşük olduğu,% 4 ila% 27 aralığında olduğu bildirilmektedir. Mediastinal lenf nodlarına metastazları yaygındır (% 46'ya kadar), ancak uzak metastazlar olarak sınıflandırılırlar (üst mediastinal lenf nodu gruplarının sınıflandırıldığı seviye VII hariç)<sup>62</sup>.

Larenks SCC'den uzak metastazlar sadece uzak organlara hematogen metastazları değil aynı zamanda boyun dışındaki lenf nodu gruplarına olan lenfatik metastazları içerir<sup>16</sup>. Uzak hematogen metastazın en sık olduğu bölge akciğerdir. Karaciğer ve iskelet sistemi (kaburgalar, omurlar ve kafatası) daha az etkilenir. Mediasten, ilk tanı anında nadir görülen fakat uzak lenfatik metastazın için en sık görüldüğü bölgedir<sup>63</sup>. Uzak metastaz gelişen hastalarda hemen hemen her zaman hastalıkları sırasında bir aşamada tanı konmuş bölgesel metastazlar vardır. Uzak metastaz insidansı primer tümörün bulunduğu bölgeye göre değişir: glottik SCC'de oran% 3.1-8.8 arasındadır ve supraglottik SCC'de% 3.7-15 arasındadır. Subglottik SCC'den uzak metastazların sıklığı net bilinmemektedir, çünkü bu bölgedeki primer tümörler nadirdir; bununla birlikte, Spector ve arkadaşları<sup>63</sup>, subglottik SCC'lerin % 14,3'ünün uzak metastaz geliştirdiğini gözlemlemiştir. Uzak metastaz riskinin artmasıyla ilişkili klinik ve patolojik faktörler arasında ileri evre primer tümör, özellikle evre T4; servikal metastazların varlığı, özellikle N2 ve N3; servikal metastazların süresi, seviyesi ve ekstrakapsüler yayılımı; ve lokal bölge nüksüdür<sup>63-65</sup>. Ciltteki lenfatik metastaz da ilerlemiş bir hastalık belirtisidir ve uzak metastazlara benzer şekilde, ciddi olarak prognozu olumsuz etkiler<sup>66</sup>.

Tanı koymak için yapılması gereken ilk şey iyi bir anamnez ve detaylı fizik muayenedir. Dispne, stridor, ses kısıklığı gibi şikayetlerle baş vuran hastalardan anamnez alınırken larenks kanseri risk faktörlerinin de sorgulanması gerekmektedir. Tedavi sürecini etkileyebilecek diğer medikal durumlar ve komorbiditeler de kaydedilmelidir.

Larenks kanserinden şüphelenilen bir hastada tam bir baş boyun muayenesi yapılmalıdır. İlk muayenede acil girişim gerektirebilecek bir patoloji olup olmadığı belirlenmelidir. Örneğin ciddi solunum sıkıntısı ile başvuran bir hastada larenksi obstrükte eden bir kitle tespit edilmesi halinde acil hava yolunun sağlanması gibi bir durumda ilk fizik muayenede lezyonun tespitinin ardından solunum yolu güvene alınmalıdır. Tam bir fizik muayenede primer tümörün kaynaklandığı bölge ve uzanımı, boyun lenfatik istasyonlarının palpasyonu ve üst solunum ve sinidirm yolunun ikinci bir lezyon varlığını değerlendirmek adına detaylı değerlendirmesinin tespiti gerekmektedir.

Günümüzde larenksin görüntülenmesi için en sık baş vurulan yöntem indirek laringoskopidir. Önceleri larenks aynası ile yapılmakta olan bu muayene günümüzde yerini endovizyon sistemlerine bırakmıştır. Rijit, 70 veya 90 derece açılı teleskoplar ile larenks ve hipofarenksin tam görüntülenmesi gerekirse kayıt alınmasına olanak sağlar. Daha güncel yöntemlerden olan videostroboskopi özellikle vokal kordların ufak lezyonlarının tespitinde çok büyük avantaj sağlamaktadır. Bu yöntemle vokal kord mukozal dalgalanma hareketini bozan ufak lezyonlar tespit edilebilmekte ve tedavi öncesi ve sonrasında bu mukozal dalgalanmanın ne kadar etkilendirği dokümente edilebilmektedir. Fakat videolarinoskopi intraepitelyal neoplazileri invaziv karsinomdan ayırt etme konusunda çok güvenilir değildir ve lezyonun invazyon derinliği hakkında da güvenilir bilgi vermez<sup>67</sup>.

Fizik muayene esnasında elde edilen bilgiler mutlaka kaydedilmeli, tespit edilen lezyonun yeri, uzanımı, vokal kordların hareketlilik durumu ve hava pasaj açıklığı not edilmelidir. Buna ek olarak boyun palpasyonunda ele gelen kitle lezyon mevcutsa yer aldığı boyun seviyesi, göreceli olarak çapı, hareketliliği, çevre dokuya belirgin invazyon bulgusu gösterip göstermediği de kaydedilmelidir. Kesin tanı ise biyopsi ile konulur.

Değerlendirmenin en önemli aşamalarından bir tanesi de görüntüleme yöntemleridir. Eğer yapılması mümkünse tanısal amaçlı yapılacak olan biyopsiden önce yapılması önerilir. Biyopsi sonrası yapılması halinde biyopsi alınan bölgede gelişecek olan inflamasyon ve ödem görüntüleme yönteminin güvenilirliğini düşürebilmektedir<sup>68</sup>. Görüntüleme yöntemine baş vurulmadan önce yapılan endoskopik değerlendirme cerraha lezyonun yüzeysel uzanımı hakkında bilgi sağlar ve görüntüleme yöntemleri lezyonun derinliği hakkında vereceği bilgi ile fizik muayenede elde edilen bilgilerin tamamlanmasına yardımcı olur. Endoskopik muayenede yüzeysel gibi görünen bir lezyonun görüntüleme yöntemlerinde derine uzanım göstermesinin tespit edilmesi halinde tanısal biyopsi sınırları buna göre genişletilebilir ve hastalığın evrelemesi daha doğru olarak yapılabilir. Larenks kanserinden şüphelenilen olgularda en sık kullanılan görüntüleme yöntemleri kesitsel bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans (MR) görüntülemesidir.

En sık kullanılan değerlendirme yöntemi BT olsa da MR'ın BT'ye üstün olduğu bazı durumlar mevcuttur. BT kemik ve kartilaj yapılarıdaki kemikleşmenin değerlendirilmesi açısından MR'a üstündür<sup>67</sup>. MR ise kartilaj invazyonunu tespit etmede ve yumuşak dokuları değerlendirmede BT'ye üstünlük göstermektedir. MR'ın dezavantajlarından bazıları; pahalı ve uzun çekim süresi olan bir görüntüleme yöntemi olmasıdır, bu sebeple hareket artefaktından

daha çok etkilenir ayrıca kemik yapı değerlendirme ve kemik invazyonu değerlendirme oranları daha zayıftır. Ayrıca kalp pili olan veya vücudunda ferromanyetik protez bulunan hastalarda MR kontraendikedir. Ayrıca MR'ın primer tümör ve tümörün çevresindeki reaksiyonel inflamasyon sınırları net ayırt edememesi de yanlış pozitif sonuçlar alınmasına sebep olabilmektedir<sup>69</sup>.

BT görüntüleme ekstralarengeal yapıların ve boyun bölgelerinin değerlendirilmesine olanak veren boyun taramasını içerir. Vokal kordların hacminin kesintiye uğramaması için 1mm gibi çok ince ve çoklu planda kesitler alarak larenksin görüntülenmesini sağlar<sup>70</sup>. Aksiyal planda yapılan kesitler vokal kordlara paralel olarak geçecek şekilde ayarlanır, bu sayede tümör lokalizasyonu ve tümörün uzanımı hakkında gerçeğe en yakın görüntüleme elde edilmesi sağlanır<sup>68</sup>. İntravenöz kontrast özellikle önemlidir, çünkü primer tümör genellikle kontrastla belirginleşir, böylece görülmesi daha net olur ve kontrast, boyunda olası bir lenf nodu tutulumunu ve damarların belirginleşmesini sağlayarak bu lezyonların büyük damarlarla olan ilişkisini belirlemede çok önemli bilgiler sağlamış olacaktır. Gadolinyum kontrastlı T1 ağırlıklı görüntüleri kullanan MR, patolojik dokunun daha net olarak değerlendirilmesine olanak sağlar, ancak bazı yazarlar kontrast kullanımının larenks tümörlerini değerlendirmede hiçbir bilgi katmadığını öne sürmüştür<sup>71,72</sup>. Yağ baskılı sekansları olan özel MR serileri, özellikle paraglottik ve preepiglottik alanları değerlendirirken oldukça yardımcı olur<sup>68</sup>.

Pozitron emisyon tomografi (PET), radyoaktif olarak işaretlenmiş glukoz (18 F-fluorodeoxyglucose [FDG]) kullanılarak yapılan bir görüntüleme yöntemi olup inflamasyon ve malignitenin birbirinden ayırt edilmesine olanak sağlar<sup>73</sup>. Baş boyun bölgesi kanserlerinde PET, BT ile kombine edildiği zaman daha faydalıdır. Bu kombinasyon anatomik lokalizasyonu belirlemede daha üstündür<sup>74</sup>. PET'in kullanım alanları arasında malignite evrelemesi, özellikle bölgesel ve uzak metastazların tespiti, primeri bilinmeyen lezyonların değerlendirilmesi ve tedavi sonrası nüks ve rekürrens açısından takip yer almaktadır<sup>75</sup>.

Larenks SCC'de radyolojik görüntüleme yöntemleri büyük önem taşımaktadır. Endoskopik yöntemler her ne kadar primer tümör ile ilgili pek çok değerli bilgi verse de tümörün invazyon derinliğini değerlendirmek açısından yetersizdir. Larenksin kartilaj bir çatıya sahip olması, bu organın palpasyonunda invazyon derinliğine ait muayene bulgularının da yetersiz olmasını sağlar. Örneğin tiroid kartilaj iç laminasının invazyonunu, krikoid kartilaj tutulumunu, paraglottik veya preepiglottik alan invazyonunu endoskopik olarak veya palpasyon ile tespit etmek mümkün değildir.

Preepiglottik alanın invazyonu BT’de yağlı dokunun kaybı ve tümörün bu bölgeyi doldurması ile tespit edilir<sup>70</sup>. MR’da ise T1 ağırlıklı görüntülemelerde düşük veya orta derece sinyal değişikliği ve T2 ağırlıklı görüntülemelerde ise yüksek sinyal değişikliği ve kontrastlı görüntülemelerde T1 ağırlıklı görüntülerde kontrast tutması ile tespit edilir<sup>70</sup>. Preepiglottik alan ve dil kökü invazyonunu değerlendirmede MR, BT’ye üstündür<sup>76</sup>. Tiroid ve krikoid kartilaj invazyonunun görüntüsü bu kartilajların ossifikasyon derecesine bağlıdır. BT kalsiyum ve kemik değerlendirmede MR’a üstün olsa da kartilaj invazyonu değerlendirmesinde MR, BT’ye üstündür<sup>69,77,78</sup>. Kartilaj invazyonu değerlendirmesinde MR’ın yüksek negatif prediktif değeri vardır fakat reaktif inflamasyon ile tümörün ayırt edilmesi konusunda iyi değildir. Bu sebeple düşük spesifitelidir ve pozitif prediktif değeri yaklaşık olarak %70’tir<sup>69,77,78</sup>. BT kartilaj invazyonu değerlendirme açısından MR’dan daha az sensitiftir. Ekstralarengeal uzanımın BT bulguları skleroz, erozyon ve lizis olup kartilaj invazyonunu düşündürür<sup>77</sup>. Ayrıca subglottik tümörlerde krikoid kartilaj invazyonunun değerlendirilmesi açısından MR, BT’ye daha üstündür<sup>79</sup>. Kartilaj invazyonunun doğru değerlendirmesi evreleme açısından oldukça önemlidir. Endoskopik değerlendirmede T1 gibi görülen bir tümörde tiroid kartilaj invazyonu tespit edilmesi T evresini T3 veya T4a’ya yükseltecektir. Bu tümörlerin radyoterapiye olan düşük duyarlılıkları, kötü prognozla ilişkili olması, lokal kontrolün zor olması ve kondroradyonekroz riskinin yüksek oluşu tanı ve tedavi planlaması açısından önemli bilgiler sağlar<sup>69,80</sup>.

Görüntüleme yöntemleri primer lezyon hakkında olduğu kadar boyun lenfatik istasyonları açısından da önemli bilgiler sağlar. BT veya MR boyna lenfatik metastazın saptanmasında fizik muayene ve ultrason görüntülemeye (USG) üstündür fakat USG eşliğinde yapılan ince iğne aspirasyon biyopsi (İİAB) ve PET en doğru tanısal bilgiyi sağlar<sup>81</sup>. Larengeal kanserin tedavi öncesi değerlendirilmesinde PET sıklıkla başvurulmuş bir yöntem değildir. BT ile kombine edilmiş PET, anatomik olarak daha doğru veriler sağlamakta olup kullanım sıklığı artmaktadır<sup>82</sup>. Günümüzde mikroskopik hastalığı tespit edebilecek bir görüntüleme yöntemi henüz geliştirilmemiştir. Klinisyenler radyolojik ve klinik olarak negatif olan boyna yaklaşım kararını okült metastaz oranlarına bakarak vermelidir.

Larenks kanserinin en sık uzak metastaz alanı ve en sık ikinci primerin tespit edildiği bölge akciğerlerdir. Olası akciğer tutulumunu dışlamak için toraks BT ile değerlendirme yapılabilir. Primer tümörü ileri evre olan ve derin servikal lenfatiklere metastazı olan hastalarda

uzak metastaz oranı da yüksek olduğundan tedavi öncesi PET-BT ile uzak metastaz değerlendirmesi yapılması gerekir<sup>82</sup>.

Larenks kanserinden şüphelenilen olgularda yapılması gereken bir diğer tanısal adım genel anestezi altında larenks muayenesi ve biyopsidir. Genel anestezi altında muayene primer tümörün yaygınlığı konusunda çok değerli bilgiler sağlar ve şüpheli alanlardan biyopsi alınarak tanının doğrulanmasında yardımcı olur. Vokal kord hareketinin azaldığı veya vokal kordların hareketsiz olduğu durumlarda genel anestezi altında muayene esnasında vokal kord ve aritenoidlerin palpasyonuna olanak sağlar ve durumun aritenoid invazyonu veya vokal kas invazyonu kaynaklı olup olmadığı konusunda değerli bilgiler sağlar. Tanıda altın standart biyopsidir.

Genel anestezi altında yapılacak direk laringoskopi de dikkat edilmesi gerek bazı hususlar vardır. Özellikle solunum pasajını ciddi şekilde daraltan lezyonu olan hastalarda entübasyonun zorluğu açısından anestezi ekibine bilgi verilmeli gerekirse ameliyat öncesi lokal anestezi altında trakeotomi açılmalıdır. Trakeotomi açılması gerekiyorsa mümkün olduğu kadar trakeal halkanın korunması açısından yüksek trakeotomi seçilmelidir. Trakeotominin tedavi edici operasyondan önce açılması ile peristomal nüks arasındaki ilişki net olarak bilinmemekle birlikte, peristomal nüks için risk faktörlerinin ileri lokal tümör ve özellikle subglottik uzanımı olan lezyonlar olduğu bilinmektedir<sup>83-86</sup>.

### **2.2.5. LARENKS SCC TNM EVRELEMESİ**

Larenks kanserleri TNM(T: Tümör, N:Lenf nodu, M:Metastaz) sistemi kullanılarak evrenir. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Kanser Evreleme Kılavuzu 8. edisyonda larenks kanserinin T evresi 7.edisyon ile aynıdır<sup>87</sup>. N evrelemesine ekstra nodal invazyon (ENİ) kriteri getirilmiştir. HPV kaynaklı olmayan baş boyun kanserlerinde ENİ son derece önemli bir prognostik öneme sahiptir<sup>88</sup>. Klinik evrelemede yalnızca bariz invazyon gösteren lenf nodları değerlendirmeye alınır. Günümüzde kullanılan hiçbir görüntüleme yöntemi mikroskopik düzeydeki ENİ'yi göstermede başarılı değildir. Fakat klinik olarak bariz invazyon bulguları mevcut olan lenf nodu metastazları (örn; cilt invazyonu, çevre kas veya yapılar invazyon, invaze olan siniri ait bulguların mevcut olması gibi) ve radyolojik olarak invazyon lehine güçlü bulguları olan lenf nodları klinik N evrelemesinde N3b olarak evrenir. Eğer evrelenen lenf nodlarında ENİ belirgin değilse ENİ negatif olarak değerlendirilir<sup>89</sup>.



Evreleme sistemi hastanın prognoz ve sağ kalımını tayin etmede uyumlu olmalıdır. Yıllar içerisinde geliştirilmiş olan TNM sistemi güçlü prognostik değere sahiptir ve dünya çapında kullanılmaktadır. ENİ'nin tespit edilmesi halinde N evresi bir evre ilerler.

Larenks kanserinde T evresi, larenksin alt anatomi gruplarına göre farklı olarak evrenir. Lateral veya posterior faringeal duvar, piriform fossa, postkrikoid bölge veya dil kökünden kaynaklanıp larenkse uzanan kanserlerin evrelemede bu T sistemi kullanılmaz.

Larenks T evresinde larenks 3 bölgeye ayrılır; supraglottis, glottis ve subglottis. Supraglottiste; epiglotun larengeal ve lingual yüzleri, aryeepiglottik foldların larengeal yüzleri, aritenoidler ve ventriküler bandlar vardır. Evreleme açısından epiglot suprahoid ve infrahyoid olmak üzere 2 parça olarak değerlendirilir. Hyoid kemikten geçen horizontal plan ile ikiye ayrılır. Supraglottisin inferior sınırı, vokal kordların süperior yüzünden, ventriküllerin lateral sınırından geçen horizontal planın üstü olarak kabul edilir. Glottis gerçek kordların süperior ve inferior yüzlerini, anterior ve posterior komissürü içerir. Horizontal planda 1 cm kalınlıktaki bir alandır. Subglottis ise gerçek vokal kordların inferior yüzünden krikoid kartilajın alt sınırına kadar olan kısımdır<sup>7</sup>.

Rejyonel lenf nodu metastazı riski T kategorisi ile ilişkilidir. Larenks kanserinde lenf nodu metastaz riski, tümörün kaynaklandığı larengeal bölge ve primer tümörün T evresi ile ilgilidir. Gerçek vokal kordlar lenfatik drenaj bakımından fakirdir, glottise sınırlı olan tümörler çok nadiren boyna lenf nodu metastazı yaparlar. Bunun tam aksine supraglottik bölge lenfatik drenajdan zengin ve bilateral olarak lenfatik drenaja sahiptir, primer olarak supraglottik bölgeden kaynaklı olan tümörler sıklıkla bölgesel lenf nodu metastazı yapar. İleri glottik tümörler direk olarak yumuşak dokuya, prelarengeal, pretrakeal, paralarengeal ve paratrakeal lenf nodlarına, üst, orta ve alt juguler lenf nodlarına metastaz yapabilir. Supraglottik tümörler sıklıkla üst ve orta juguler lenf nodlarına drene olur, submental ve submandibuler lenf nodlarına metastazları daha nadir, retrofarengeal lenf nodlarına bazen metastaz yaparlar. Subglottik alandan primer olarak kaynaklanan tümörler nadirdir. Bu bölge tümörleri hızla ilk olarak çevre yumuşak dokulara ve prelarengeal, pretrakeal, paralarengeal ve paratrakeal lenf nodlarına sonra da orta ve alt juguler lenf nodlarına metastaz yapar. Kontralateral lenfatik yayılım sıktır. Baş boyun bölgesine daha önce yapılmış cerrahi girişimler, radyoterapi öyküsü lenfatik drenajı değiştirebilir ve genellikle görülmeyen alanlara lenf nodu metastazlarına rastalanabilir<sup>7</sup>.

Sadece büyük kitlesel lenf nodu metastazı olan hastalarda uzak metastaz görülür. Uzak metastaz olursa en sık bölge akciğerlerdir, kemik veya karaciğer metastazları daha nadirdir. İnnominate arterin sefalik kısmında bulunan, anterior süperior mediastinumun yer aldığı yedinci bölge metastazları dışındaki mediastinel lenf nodları uzak metastaz olarak değerlendirilir<sup>7</sup>.

## Klinik Evreleme

Larenksin yassı hücreli karsinomunda klinik evreleme gereklidir. Değerlendirme öncelikle larenksin direk veya indirek laringoskopi ile incelenmesi ile başlar. Tüm boyun lenfatik bölgelerinin palpasyonu şarttır. Tüm kraniyal sinirlerin nörolojik değerlendirmesi gerekir. Genellikle genel anestezi altında olan tüm endoskopi, diğer evreleme çalışmalarının tamamlanmasından sonra, tümörün yüzeyinin büyüklüğünü doğru bir şekilde değerlendirmek, vokal kord mobilitesini değerlendirmek ve biyopsiyi kolaylaştırmak için yapılır. Eş zamanlı olarak üst aerodigestif sistemin diğer primer tümörleri için dikkatli bir araştırma yapılmalıdır.

Supraglottik tümörler için primer sahanın klinik evrelemesi, supraglottik larenks ve komşuluğundaki bölgelerin ve vokal kord hareketliliğinin değerlendirilmesine dayanır. Görüntüleme, gizli submukozal transglottik uzanımı tanımlamak için faydalı olabilir. Görüntüleme yöntemlerinde preepiglotik alan veya tiroid kıkırdağının iç korteks invazyonunun görülmesi halinde T3 olarak evrelenir. Tiroid kıkırdağının dış korteksini invaze eden tümörler, T4a tümör olarak tanımlanır.

Boynun klinik değerlendirmesinde, herhangi bir nodal kitlenin maksimum büyüklüğü ölçülmelidir. Larenks kanserinde lenf nodu metastazını değerlendirmek için üç kategori vardır: N1, N2 ve N3. Orta hat lenf nodları, ipsilateral nodal metastaz olarak kabul edilir. Üst mediastinal lenf nodları bölgesel lenf nodları olarak kabul edilir (Level VII). Bölgesel lenf nodları ve kanserin etkilediği lenf nodu gruplarının bir tanımı veya haritasını çıkarılmalıdır. Klinik olarak kesin ENİ diyebilmek için; cilt infiltrasyonu, klinik incelemede komşu yapılara kas infiltrasyonu /fiksasyonu veya kraniyal sinir, brakiyal plexus, sempatik zincir veya phrenic sinirin invazyon bulguları tespit edilmelidir. Bu bariz bulguların mevcut olduğu lenf nodu metastazları klinik ENİ (ENİk) olarak kaydedilmelidir.

Günümüzde ENİ'yi net olarak belirleyebilen bir görüntüleme yöntemi henüz mevcut değildir. Fakat görüntüleme yöntemlerinde lenf nodunun amorf spiküle cidarı olması, internodal yağlı doku tutulumuna bağlı olarak yağlı dokunun kaybı veya normal oval lenf nodu

formunun ektranodal yayılımı düşündüren yuvarlak şekle dönüşmesi ENİ yönünde bulgular olmasına rağmen fizik muayene bulguları ile desteklenirse ENİ kabul edilir. ENİ'nin kesin tanısının konulabilmesi için patolojik inceleme yapılması şarttır. Günümüzdeki hiçbir görüntüleme yöntemi mikroskopik ENİ'yi tespit edememekte veya küçük metastatik lenf nodlarını santral homojenite kaybı tespit edilmediği sürece reaktif lenf nodlarından ayırt edememektedir.

Hem kontrastlı BT hem de MR görüntüleme, primer tümör ve nodal drenaj bölgelerinin mükemmel değerlendirilmesine izin verir<sup>90</sup>. PET/BT evreleme, tedavi değerlendirmesi ve sürekliliği için daha sık kullanılmaktadır. Ayrıca klinik olarak saptanamayan primer tümörün tespitinde avantaj sağlayabilir.

Glottik larenksin T1 ve T2 lezyonlarının klinik tanısının doğru yapıldığından emin olmak için kesitsel görüntüleme kullanılabilir. Görüntüleme, özellikle, lezyonların, tiroid kıkırdağının iç korteksini içerecek şekilde Broyle ligamenti boyunca öne doğru yayılabileceği anterior komissürde submukozal uzanımının varlığını tanımlamak için önemli bir yardımcı olarak kullanılabilir. Görüntüleme aynı zamanda gizli transglottik veya subglottik yayılım gösteren glottik karsinomları da tanımlayabilir. Normal paraglottik boşluğun, lateral tiroarytenoid kasının, tiroid kıkırdağının iç korteksine yakın bir şekilde yerleşmiş olmasından dolayı, gerçek vokal kord seviyesinde rutin olarak tespit edilmesi zordur. Tiroid kıkırdağının iç korteksiyle sınırlı tümör erozyonu T3 lezyonuna işaret ederken, tiroid kıkırdağının dış korteksini invaze karsinomlar bir T4a tümörünü tanımlar. T4 evresinin (a ve b) yalnızca klinik muayeneye dayanarak belirlenmesi zordur, çünkü kriterlerin çoğu endoskopi ve palpasyon ile değerlendirilemez.

#### Patolojik Evreleme

Patolojik evreleme klinik evreleme ve cerrahi olarak rezeke edilen örneğin histopatolojik çalışmasında elde edilen tüm bilgilerin kullanılmasını gerektirir. Cerrahin eksizyondan sonra ameliyat sahasında rezidüel tümör olup olmadığına dair görüşleri de değerlendirmede göz önüne alınmalıdır.

Primer alan ve/veya bölgesel lenf nodu diseksiyonların tam rezeksiyonu, ardından rezeke edilen numune/numunelerin patolojik muayenesi, pT ve/veya pN evrelemesine olanak sağlar. Radyasyon veya kemoterapiden sonra rezeke edilen örnekler tanımlanmalı ve bu

bağlamda değerlendirilmeli ve 'p' yerine 'yp' ifadesi kullanılmalıdır. pT cerrahi numunedeki fikse edilmemiş tümörün gerçek ölçümünden elde edilir. Bununla birlikte, formalin fiksasyonundan sonra rezeke edilen numunede %30'a kadar yumuşak doku büzülmesinin olabileceği not edilmelidir. Patolojik evreleme ek ve önemli bilgileri temsil eder ve evrelemeye bu şekilde dahil edilmelidir, ancak birincil evreleme şeması olarak klinik evrelemeyi desteklemez.

Skvamöz karsinomun histopatolojik derecelendirilmesinin (gradeleme) yapılması önerilir. Grade sübjektiftir ve mukozal bölgelerdeki skuamöz epitelya yakınlık veya sapma derecesine bağlı olarak, bir tanımlayıcı, aynı zamanda sayısal bir form (yani, iyi diferansiye, orta derecede diferansiye ve zayıf diferansiye) kullanır. Ayrıca, mümkün olduğunda, primer tümörün invazyon derinliğinin ve vasküler ve perinöral invazyon varlığının veya yokluğunun nicel bir değerlendirmesi yapılması önerilir. Tümörün gradelemesi evreyi değiştirmese bile kayıt altına alınmalıdır.

Herhangi bir lenf nodu diseksiyonu örneğinin patolojik açıklaması, ilgili lenf nodunun /nodlarının büyüklükleri, sayısı ve yerleri/seviyesi ve ENİ'nin varlığı veya yokluğu tanımlamalıdır. Patolojik N evrelemesi yapılması için selektif boyun diseksiyonu materyalinde 10 veya daha fazla, radikal (modifiye radikal boyun diseksiyonunda 15 veya daha fazla lenf nodu tespit edilmesi gerekir. Daha az sayıda lenf nodu eksize edilmiş veya lenf nodu sayısı uygun olduğu halde patolojik lenf nodu tespit edilememiş ise pN0 olarak evrenir.

Tüm rezeke edilmiş metastatik lenf nodları ENİ varlığı ve kapsamı açısından incelenmelidir. ENİ'nin kesin tanımı literatürde zaman içerisinde değişmiştir. Amerikan Patologlar Koleji ENİ'yi, lenf nodu sınırları içinde, lenf nodu kapsülü yoluyla, çevre dokuya bağlanan stromal reaksiyonla birlikte veya ayrı olarak, metastatik tümörün uzanması olarak tanımlar. Bu durumun derecesinin belgelenmesi için patolojik inceleme gereklidir<sup>91</sup>.

Histopatolojik incelemede tespit edilen ENİ, ENİmi (mikroskopik ENİ  $\leq 2$  mm) veya ENİma (major ENİ  $> 2$  mm) olarak tanımlanır. Hem ENİmi hem de ENİma, pN'nin tanımı için ENİ (+) olarak nitelendirilir. ENİ'nin bu tanımlayıcıları mevcut pN tanımı için gerekli olmamakla birlikte gelecekte evrelemeyi değiştirebileceğinden kayıt altına alınması önerilir<sup>92,93</sup>.

AJCC'nin son TNM evreleme kılavuzuna göre larenks kanseri TNM ve evre grupları Tablo 4-10'de özetlenmiştir.

### Primer Tümör (T)

**Tablo 4: Supraglottik tümörlerin T evrelemesi**

| T Kategorisi | T Kriteri  |
|--------------|--|
| Tx           | Primer tümör tespit edilememekte   |
| Tis          | Karsinoma in-situ  |
| T1           | Tümör supraglottisin bir bölgesine lokalizedir, vokal kord hareketi normaldir  |
| T2           | Tümör supraglottis veya glottis veya supraglottis dışında bir veya birden fazla bölgesinin mukozasını invaze etmekte olup (örn; dil kökü mukozası, valleküla, piriform sinüs medial duvarı), vokal kord hareketi normaldir                   |
| T3           | Tümör larenkse sınırlı olup vokal kord fiksedir ve/veya aşağıda belirtilen alanların bir veya birkaçını invaze etmektedir örn; postkrikoid bölge, preepiglottik alan, paraglottik alan ve/veya tiroid kartilaj iç korteksi                   |
| T4           | Lokal ileri veya çok ileri   |
| T4a          | Lokal ileri tümör<br><br>Tümör tiroid kartilaj dış korteksini invaze etmiş ve/veya larenks dışı dokulara yayılmıştır (örn; trakea, dil ekstriksik kasları, strep kaslar, tiroid gland veya özefagus dahil olmak üzere boyun yumuşak dokular) |
| T4b          | Çok ileri tümör<br><br>Tümör paravertebral alanı, karotis arteri veya medaistinal yapıları invaze etmektedir   |

**Tablo 5: Glottik tümörlerin T evrelemesi**

| T Kategorisi | T Kriteri  |
|--------------|--|
| Tx           | Primer tümör tespit edilememekte   |
| Tis          | Karsinoma in-situ  |
| T1           | Tümör vokal kordlara sınırlı olup, vokal kord hareketleri normaldir<br>Anterior veya posterior komissür tutulumu olabilir  |
| T1a          | Tümör tek vokal korda sınırlıdır   |
| T1b          | Tümör her iki vokal kordu tutumaktadır   |
| T2           | Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmakta ve/veya vokal kord hareketini kısıtlamaktadır   |
| T3           | Tümör larenkse sınırlı olup vokal kord fiksedir ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır ve/veya tiroid kartilaj iç korteksi invazedir  |
| T4           | Lokal ileri veya çok ileri   |
| T4a          | Lokal ileri tümör<br>Tümör tiroid kartilaj dış korteksini invaze etmiş ve/veya larenks dışı dokulara yayılmıştır (örn; trakea, krikoid kartilaj, dil ekstriksik kasları, strep kaslar, tiroid gland veya özefagus dahil olmak üzere boyun yumuşak dokular) |
| T4b          | Çok ileri tümör<br>Tümör paravertebral alanı, karotis arteri veya medaistinal yapıları invaze etmektedir   |

**Tablo 6: Subglottik tümörlerin T evrelemesi**

| T Kategorisi | T Kriteri   |
|--------------|---|
| Tx           | Primer tümör tespit edilememekte  |
| Tis          | Karsinoma in-situ   |
| T1           | Tümör subglottise lokalizedir, vokal kord hareketi normaldir  |
| T2           | Tümör vokal kordlara uzanır, vokal kord hareketleri normal ve/veya kısıtlanmıştır   |
| T3           | Tümör larenkse sınırlı olup vokal kord fiksedir ve/veya paraglottik alan vey/veya tiroid kartilaj iç korteksi invazedir   |
| T4           | Lokal ileri veya çok ileri  |
| T4a          | Lokal ileri tümör<br><br>Tümör krikoid veya tiroid kartilaja invazedir ve/veya larenks dışı dokulara uzanmaktadır (örn; trakea, krikoid kartilaj, dil ekstriksik kasları, strep kaslar, tiroid gland veya özefagus dahil olmak üzere boyun yumuşak dokular) |
| T4b          | Çok ileri tümör<br><br>Tümör paravertebral alanı, karotis arteri veya medaistinal yapıları invaze etmektedir  |

## Lenf Nodu Evrelemesi (N)

**Tablo 7: Klinik Lenf Nodu (kN) Evrelemesi**

| N Kategorisi | N Kriteri  |
|--------------|--|
| Nx           | Rejyonel lenf nodları değerlendirilememekte  |
| N0           | Rejyonel lenf nodu metastazı yok   |
| N1           | Tek, ipsilateral, $\leq 3$ cm, ENİ (-) lenf nodu metastazı                           |
| N2           |  |
| N2a          | Tek, ipsilateral, $> 3$ cm fakat $< 6$ cm, ENİ(-) lenf nodu metastazı                |
| N2b          | Multiple, ipsilateral, her biri $< 6$ cm, ENİ(-) lenf nodu metastazları              |
| N2c          | Bilateral veya kontralateral, her biri $< 6$ cm, ENİ (-) lenf nodu/nodları metastazı |
| N3           |  |
| N3a          | $\geq 6$ cm ve ENİ(-) lenf nodu metastazı  |
| N3b          | Klinik olarak bariz ENİ(+) lenf nodu/nodlarına metastazı                             |

Not: Krikoid kartilaj üstünde yerleşimli lenf nodları (Ü), altında yerleşimli lenf nodları (A) ile belirtilebilir



**Tablo 8: Patolojik Lenf Nodu (pN) Evrelemesi**

| N Kategorisi | N Kriteri  |
|--------------|--|
| Nx           | Rejyonel lenf nodları değerlendirilememekte  |
| N0           | Rejyonel lenf nodu metastazı yok   |
| N1           | Tek, ipsilateral, $\leq 3$ cm, ENİ (-) lenf nodu metastazı   |
| N2           |  |
| N2a          | Tek, ipsilateral, $\leq 3$ cm, ENİ (+) lenf nodu metastazı<br>veya<br>Tek, ipsilateral, $> 3$ cm fakat $< 6$ cm, ENİ(-) lenf nodu metastazı  |
| N2b          | Multiple, ipsilateral, her biri $< 6$ cm, ENİ(-) lenf nodu metastazları  |
| N2c          | Bilateral veya kontralateral, her biri $< 6$ cm, ENİ (-) lenf nodu/nodları metastazı   |
| N3           |  |
| N3a          | $\geq 6$ cm ve ENİ(-) lenf nodu metastazı  |
| N3b          | Tek, ipsilateral, $> 3$ cm ve ENİ(+ ) lenf nodu metastazı<br>veya<br>Multiple ipsilateral, bilateral veya kontralateral, herhangi bir boyutta ENİ(+ ) lenf nodu/nodları metastazı<br>veya<br>Tek, kontralateral, herhangi bir boyutta ve ENİ(+ ) lenf nodu metastazı |

Not: Krikoid kartilaj üstünde yerleşimli lenf nodları (Ü), altında yerleşimli lenf nodları (A) ile belirtilebilir

## Metastaz

**Tablo 9: Metastaz Evrelemesi (M)**

| M Kategorisi | M Kriteri         |
|--------------|-------------------|
| M0           | Uzak metastaz yok |
| M1           | Uzak metastaz var |

## Evreleme Grupları

**Tablo 10: AJCC Prognostik Evre Grupları**

| T              | N              | M  | EVRE |
|----------------|----------------|----|------|
| Tis            | N0             | M0 | 0    |
| T1             | N0             | M0 | I    |
| T2             | N0             | M0 | II   |
| T3             | N0             | M0 | III  |
| T1,2,3         | N1             | M0 | III  |
| T4a            | N0,1           | M0 | IVA  |
| T1,2,3,4a      | N2             | M0 | IVA  |
| Herhangi bir T | N3             | M0 | IVB  |
| T4b            | Herhangi bir N | M0 | IVB  |
| Herhangi bir T | Herhangi bir N | M1 | IVC  |

### 2.2.6. LARENKS SCC TEDAVİSİ

Larenks SCC tedavisinin amaçları; kür sağlanması, mümkün olduğunda larenksin korunması, korunan larenksin fonksiyonel olması ve tedavinin getireceği morbiditenin en aza indirilmesidir. Fonksiyonel bir larenks, konuşmaya olanak sağlarken aspirasyon olmadan oral alımın gerçekleştirebilmeli ve burun ve ağızdan trakeotomi olmadan yeterli solunumu

sağlayabilmelidir. Doğru tedavinin seçilebilmesi için doğru histopatolojik tanı konması, primer tümörün yayılımının doğru bir şekilde tespit edilmesi ve doğru TNM evrelemesi yapılması şarttır. Doğru evrelemenin önemi azımsanmamalıdır bu sebeple hastanın tedavi öncesi değerlendirilmesi oldukça önemlidir.

Larenks kanseri tedavi seçenekleri arasında radyoterapi (RT), cerrahi yer almaktadır. Larenksin korunmasını sağlayan parsiyel (kısmi) larenkjektomi tekniklerinin gelişmesi, RT ve kemoterapi tedavilerindeki gelişmeler pek çok tedavi seçeneğinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Genel olarak erken evre tümörlerin (Evre I ve II) tedavisinde tek aşamalı tedavi yani tek başına RT veya cerrahi tercih edilirken ileri evre tümörlerde (Evre III ve IV) kombine tedavi yani cerrahiye takiben RT veya kemoradyoterapi (KRT) veya KRT/RT'yi takiben kurtarma cerrahisi uygulanmaktadır. Uygulanacak tedavi yöntemine karar verilirken hastalığın evresinin yanı sıra hastaya ait faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Hastaya ait faktörlerden bazıları; yaş, eşlik eden komorbiditeler, genel sağlık durumu, performans durumu, ses ile ilgili beklentiler, tedavi ve takibe uyumluluk, sigara veya alkol kullanımı, beslenme durumu, kişinin tedavi merkezine olan uzaklığı ve hastanın tercihleridir. Tümöre ait faktörler tümörün histopatolojisi, primer tümörün kaynaklandığı bölge, TNM evresi, yeterli rezeksiyon sınırı sağlanıp sağlanamayacağı, ekstrakapsüler yayılım, perinöral invazyon varlığı, lenfovasküler invazyon varlığıdır. Tedavi ve takibi etkileyebilecek diğer faktörler tedavinin yapılacağı merkez ve ekibin cerrahi ve onkoloji tecrübe ve yeterliliğidir.

### **2.2.6.1 GLOTTİK SCC TEDAVİSİ**

Glottik SCC tedavisine karar vermeyi etkileyen en önemli husus tümörün evresidir.

#### **Erken Evre Glottik SCC Tedavi Seçenekleri**

T1N0M0 (Evre I) ve T2N0M0 (Evre II) glottik tümörler, erken evre olarak kabul edilir. Tedavinin tek bir tedavi yöntemi ile yapılması önerilir ve seçenekler arasında primer RT ve cerrahi vardır<sup>94</sup>. T1 glottik tümörlerde primer RT'nin 5 yıllık lokal kontrol oranları %81-90 arasında, larenks koruma oranları %90-98 oranında bildirilmiştir<sup>95-97</sup>. Aynı oranlar vokal kord hareketinin normal olduğu T2 tümörler için sırasıyla %64-87, %75-87 arasında bildirilmiştir<sup>95,98,99</sup>. Primer tümörün tanısı esnasında alınan biyopsi ile tam olarak eksize edilmesi mümkün olduğundan primer RT başarı oranları olduğundan yüksek çıkmakta olabilir. Stutsman ve McGarvan'ın yapmış oldukları çalışmada erken evre glottik SCC nedeniyle

parsiyel larenjektomi yapılmış olan 60 hastadan 12'sinin patolojik spesimenlerinde tespit edilebilir bir tümör dokusuna rastlanmamıştır<sup>100</sup>.

Erken evre glottik SCC'nin cerrahi tedavi seçenekleri arasında larenksi koruyucu larenks cerrahisi veya parsiyel larenjektomi yer almaktadır. Açık cerrahi seçenekleri arasında açık kordektomi ve vertikal hemilarenjektomi (VHL) yer almaktadır. Açık kordektomide larengofissürü takiben etkilenen vokal kordun tam eksizyonu yapılmaktadır. VHL'de ise etkilenen vokal kord ile birlikte yalancı kord ve tiroid kartilaj iç lamina da eksize edilir. VHL'de eksizyona tiroid kartilaj lamina dahil edilerek komşu yumuşak dokuların pasaja doğru medialize olarak glottisin vokal rekonstrüksiyonuna katkıda bulunması sağlanabilir veya tiroid kartilaj lamina eksize edilmeden strep kaslar gibi çevre yumuşak dokunun lamina medialine transpoze edilmesiyle glottik bölge rekonstrükte edilebilir. VHL eksizyon sınırları genişletilerek eksizyona anterior komissür, karşı vokal kord, aritenoid, supraglottik veya subglottik uzanımın olduğu bölgeler dahil edilerek modifiye edilebilir. Açık cerrahinin lokal kontrol oranları %90-98, larenks koruma oranları %93-98 arasında bildirilmiştir<sup>101,102</sup>.

Endoskopik yaklaşım tekniklerinin gelişmesi ile birlikte larenksin destekleyici yapıları bozulmadan lezyonun tam eksizyonu gerçekleştirilebilir. Transoral lazer mikrocerrahi (TLM) sonrası Tis-T1,T2 glottik tümörler için %80-94 oranında lokal kontrol ve %94 gibi daha yüksek larenks koruma oranları bildirilmiştir. TLM'nin açık cerrahiye olan avantajlarından bir diğeri de trakeotomiye ihtiyaç olmaması, hastanede kalış süresinin daha kısa oluşu ve ameliyat sonrası disfajinin daha az olmasıdır<sup>103,104</sup>.

Vokal kordun orta 1/3'üne lokalize tümörlerin TLM ve açık cerrahi sonrası lokal kontrol oranları %100, primer RT ile %95 olarak bildirilmiştir<sup>105</sup>. İnvazyon derinliğinin tedavi öncesi yanlış değerlendirilebilmesi RT'nin başarısızlığının bir sebebi olabilir. RT'nin tedavi başarısı yüksek olsa da nüks veya rekürrens durumlarında ikinci kez kullanılamaz fakat cerrahi takiben gelişebilecek nüks veya rekürrenslerde RT veya tekrar cerrahi yapılabilir. Primer RT sonrası rekürrens gelişmiş olan olgularda organ koruyucu cerrahi mümkün olmayabilir.

Vokal kord hareketinin azaldığı T2 glottik tümörlerin tedavisinin planlanması daha fazla özen gerektirmektedir. TNM evrelemesine göre tümörün subglottik veya supraglottik uzanımının olması T2 olarak evrenirken vokal kord hareketinin kısıtlanması da T2 olarak evrenir. Bu iki durum arasında vokal kord hareketinin kısıtlı olması daha kötü prognozlu

seyreder. Vokal kord hareketinin kısıtlı olduğu durumlar tümörün artmış kitlesine veya derin yapıların invazyonuna bağlıdır. Bu lezyonların tümör yükleri daha fazla olduğundan primer RT etkisi daha azdır. Fein ve ekibi 15mm'den daha ufak olan tümörlerde primer RT sonrası rekürrens oranının %4, daha büyük olan tümörlerde tümör tek bir korda sınırlı ve aynı evrede olsa bile %26 olduğunu bildirmiştir<sup>95,106</sup>. T2 tümörlerin primer RT sonrası lokal rekürrens oranı %30'lara kadar çıkarmaktadır<sup>107</sup>. Harwood ve ekibi T2 lezyonlarda vokal kord hareketinin azalmasının lokal kontrolü güçleştirdiğini göstermiş olup vokal kord hareketine göre T2 evrelemesinin T2a ve T2b olarak iki alt kategoriye ayrılmasını önermiştir<sup>108</sup>. T2a lezyonlarında lokal kontrol oranları %70 iken T2b lezyonlarında bu oran %51 olarak raporlanmıştır. T2a lezyonlarda rekürrens %11 iken T2b'de bu oran %26'ya kadar çıkmaktadır<sup>109</sup>.

Primer RT veya cerrahi sonrası ses kalitesi sonuçları tümörün yaygınlığı ve invazyon derinliğine bağlıdır. Yüzeysel lezyonların tedavisi sonrası ses kalitesi daha iyi iken daha derine invaze olup vokal kordu tutan tümörlerde tedavi sonrası ses kalitesi, tedavi modalitesinden bağımsız olarak, daha kötüdür. Ayrıca daha derin invaze olan tümörlerin primer RT ile lokal kontrol oranları daha düşüktür. Daha derin invazyon olan tümörlerde, tümör yayılımının daha doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlamanın yanında bazı vakalarda T evresinin ilk değerlendirmede belirlenenden daha yüksek olduğunu da gösterebilmesi açısından cerrahi tedavinin seçilmesi önerilmektedir. Küçük yüzeysel lezyonların cerrahi tedavi veya primer RT sonrası ses kalitesi genellikle benzer ve iyidir<sup>110</sup>.

Erken glottik karsinomlarda tedavi başarısını etkileyen bir diğer önemli faktör anterior komissür tutulumudur. Glottik lezyonların anterior komissüre uzanmış olması tümör evresini değiştirmez. Vokal korda sınırlı, kord hareketini etkilememiş olan bir lezyon anterior komissüre uzansa bile T1 tümör olarak evrelenir. Fakat anterior komissür anatomik ve histolojik olarak oldukça önemli bir bölgedir. Anterior komissür tendonunun bulunduğu bölgede perikondriumun olmayışının kartilaj invazyonunu kolaylaştırabileceği ve bu bölgenin anatomik değerlendirmesinin zor oluşu tümörün yanlış olarak daha düşük olarak yapılmasına sebep olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı, bu bölgenin tutulduğu durumlarda lokal kontrol oranlarının daha düşük olduğu bilinmektedir<sup>111,112</sup>. Kirchner ve ekibinin yaptığı bir çalışmada anterior komissür tendonu kanser invazyonu açısından önemli bir bariyer olduğu, derin invazyon supraglottis veya subglottis uzanımı olan lezyonlarda görüldüğü tespit edilmiştir. Supraglottik yayılımın preepiglottik alana, subglottik uzanımın tiroid kartilaj ve krikotriod membrana invazyonu kolaylaştırdığı sonucuna varılmıştır<sup>113</sup>.

Anterior komissür tutulumu olan T1 tümörlerin tedavisinde frontolateral VHL lokal kontrol oranları %80-90 arasında bildirilmiştir<sup>114,115</sup>. Anterior komissür ve vokal kordların ön 1/3'ünün eksizyonunu sağlayan suprakrikoid parsiyel larenjektomi (SKPL) daha geniş eksizyon yapılmasına olanak sağlar. SKPL yapılmış olan anterior komissür tutulumlu T1-T2 tümörlerde 5 yıllık lokal kontrol oranları %94,5-98 arasında bildirilmiştir<sup>116,117</sup>. SKPL'nin onkoloji sonuçları etkileyici olsa da ses kalitesi oldukça kötüdür.

Anterior komissür tutulumlu erken glottik SCC'nin TLM ile tedavi sonrası sonuçları tartışmalıdır. Bazı yazarlar anterior komissür tutulumu olan olgularda vizüalizasyonun kısıtlı olması sebebiyle lokal başarısızlık oranının daha yüksek olduğunu bildirirken<sup>118</sup>, bazı yazarlarsa anatominin düzgün olarak ortaya konduğu vakalarda lokal kontrolün sağlanabileceğini raporlamıştır<sup>112,119,120</sup>. Anterior komissür tutulumu olmayan T1a tümörlerde TLM ile lokal kontrol oranı %90 olarak bildirilmiş olup anterior komissür tutulumu olan T1a tümörlerde bu oran %84 olarak raporlanmıştır. Larenks kontrol oranları anterior komissürün tutulmadığı durumlarda %99 iken tutulduğu olgularda %93 olarak bildirilmiştir. T1b ve T2 tümörlerde anterior komissürün tutulmasının etkileri benzerdir.

### **İleri Evre Glottik SCC Tedavi Seçenekleri**

Evre III ve IV lezyonlar ileri glottik tümörlerdir. Bu lezyonlar, vokal kord fiksasyonu, kartilaj invazyonu, tümörün transglottik yayılımı, subglottik uzanım, larengeal çatının invazyonu, ekstralarengeal yayılım, lenf nodu metastazı ve uzak metastazı olan lezyonlardır ve kötü prognozla ilişkilidir.

Glottik T3 tümörlerin davranışı oldukça değişkendir, primer tümörün evresi ileri olsa da boyun lenf nodlarına metastaz oranları düşüktür. T3 tümörler vokal kordu invaze edip vokal kordu fikse eden küçük tümörlerden, transglottik uzanımı olup vokal kord fiksasyonuna neden olan büyük tümörlere kadar değişken bir aralıktır. Tümör volümünün artışı ve transglottik yayılım gösteren T3 tümörler daha agresif olup lenf nodu metastaz riski daha yüksektir ve tedavi yanıtı daha kötüdür. Tümörün 1,5cm'den daha büyük olduğu, subglottik uzanım, lenf nodu metastaz varlığı veya paratrakeal, pretrakeal lenf nodu tutulumu olması kötü prognostik faktörlerdir<sup>121,122</sup>.

T3 tümörlerin tedavisinde geleneksel olarak tek aşamada total larenjektomi yapılabilir. Seçilmiş vakalarda parsiyel larenjektomi yapılabilir. T3 tümörlerde açık parsiyel

larenjektominin 2 yıllık sağ kalım oranları %60 olarak bildirilmiş olup, rekürrens görülen olguların neredeyse tamamının subglottik uzanım gösteren lezyonlar olduğu bildirilmiştir<sup>123</sup>. Subglottik uzanımın 5mm'den fazla olduğu durumlarda eksizyon sınırlarının krikoid kartilajı da içerdiği parsiyel larenjektomilerde 2 yıllık lokal kontrol oranları %73 olarak raporlanmıştır<sup>124</sup>.

T3 tümörlerde primer RT'nin lokal kontrol oranları %50 civarında olup cerrahiden daha düşüktür<sup>125</sup>. Tümör volümünün fazla olduğu vakaların primer RT cevabı daha kötüdür. Organ koruyucu cerrahiye aday olmayan vakaların tedavisinde total larenjektomi veya KRT önerilir.

T4 glottik tümörlerde organ koruyucu cerrahi çok fazla tercih edilmemektedir. Bu tümörlerin tedavisinde total larenjektomi ve bunu takip eden RT veya KRT, totale yakın larenjektomi, primer lezyon hacminin daha küçük olduğu vakalarda primer KRT seçilebilir. Subglottik uzanımın sınırlı olduğu veya interaritenoid tutulumun olmadığı seçilmiş vakalarda totale yakın larenjektomi yapılabilir<sup>126</sup>. Seçilmiş T3 ve T4 vakalarda, TLM'de ümit vaat eden sonuçlar bildirilmektedir.

T4 glottik tümörlerin primer RT ile tedavisinde lokal kontrol oranları kötüdür. KRT veya total larenjektomiyi kabul etmeyen hastalar primer RT'ye yönlendirilebilir fakat sonuçlar iyi değildir. Primer RT'ye eklenecek setüksimab gibi ajanlar, toksisitede kabul edilebilir bir artışa neden olmasının yanında, RT etkisini arttırabilir<sup>127</sup>.

Primer RT her ne kadar total larenjektomiden kaçınmayı sağlayabilse de lokal doku harabiyeti, skatrizasyon ve kalıcı ödeme sebep olur. Larenks korunmuş olsa da hava yolu daralır, ses kalitesi kötüdür, disfaji ve/veya aspirasyon gelişebilir. Tedavide primer RT'nin seçilmiş olduğu hastalar çok yakından takip edilmelidir. Bu hastalarda kurtarma tedavisi total larenjektomidir ve bu durumda kurtarma oranı %60'tır. Primer RT sonrası 6 aydan uzun süren ödem varlığında sıklıkla rekürrens söz konusudur<sup>128</sup>. Ayrıca rekürrens ve kondroradyonekrozun birbirinden ayırt edilmesi oldukça zordur. Tanı koymak için derin biyopsi alınması gerekmektedir fakat derin biyopsi kondronekrozu tetikleyebilir. Bu durumda PET/BT taraması yardımcı olabilir<sup>129</sup>.

Seçili T4a vakalarda cerrahi olmayan organ koruyucu tedavi yöntemleri önerilebilir. Fakat bu protokollerde başarı oranı T3 tümörlere göre daha düşüktür. Özellikle kartilaj

invazyonu kötü prognoz kriteridir ve organ koruyucu cerrahi olmayan tedavi protokollerinin başarısız olma riski daha yüksektir<sup>130</sup>.

Total larenjektomi yapılan olgularda palpe edilen bir anomali varsa veya subglottik uzanımın 1cm'den fazla olduğu glottik lezyonlarda, hemitiroidektomi veya subtotal tiroidektomi de yapılması önerilmektedir<sup>131</sup>. Delphian nodunun pozitif olduğu veya kartilaj invazyonunun olduğu olgularda tiroid gland invazyon riski ön görülebilir. Bu vakaların %3-8'inde tiroid glandda tümör tespit edilmiştir.

### **Glottik SCC'de Boyun Tedavisi**

Vokal kordlar lenfatiklerden fakir olduğundan, boyun lenfatiklerine metastaz, supraglottik ve subglottik lezyonlara oranla daha nadirdir. Glottik lezyonlarda boyun lenfatiklerine metastaz gerçekleşmişse sıklıkla prelaringeal, pretrakeal, paratrakeal lenf nodlarının yanında II,III,IV.seviye boyun lenfatikleri tutulur.

T1,T2 glottik SCC'de okült metastaz nadirdir ve klinik olarak N0 boyun olması halinde tedavi edilmesi gerekmez<sup>132</sup>. T3 glottik lezyonlarda boyna yönelik tedavi konusu tartışmalıdır. T3 glottik lezyonlarda okült metastaz nadirken, tümörün transglottik olarak yayıldığı vakalarda boyna metastaz ihtimali yüksektir<sup>133</sup>. T4 glottik tümörlerde okült metastaz riski %20 olup boyunun tedavisi önerilmektedir<sup>134</sup>. Primer tümör cerrahi olarak tedavi edilecekse ipsilateral selektif boyun diseksiyonu önerilir. Glottik lezyonlarda diseke edilmesi gereken bölgeler paratrakeal lenf nodları ile birlikte level II-IV arasındaki lenfatik istasyonlardır. Boyun diseksiyonu materyalinin histopatolojik değerlendirme sonuçlarına göre adjuvan RT veya KRT gerekebilir<sup>135,136</sup>. Primer tümörün tedavisinde primer RT uygulanacaksa santral boyun ve ipsilateral boyun bölgeleri irradyasyon alanına dahil edilmelidir.

T evresi ne olursa olsun klinik olarak tespit edilmiş boyun metastazı olan vakalar agresif olarak tedavi edilmelidir. Primer lezyon tedavisinde cerrahi yapılacaksa eş zamanlı olarak ipsilateral boyun diseksiyonu önerilir. Patolojiye bağlı olarak adjuvan RT veya KRT gerekebilir.

Multiple lenf nodu tutulumu, ektranodal invazyon, ekstralarengal invazyon, perinöral veya lenfovasküler invazyon olan vakalarda ameliyat sonrası RT önerilir. Ameliyat sonrası RT'ye platin-bazlı kemoterapötik ajanların eklenmesinin lokorejyonel kontrolü arttırdığı, 2



yıllık lokorejyonel kontrol oranlarını %72'den %82'ye çıkararak, başarı oranını %10 arttırdığı bildirilmiştir<sup>137,138</sup>.

Primer KRT'nin lokorejyonel kontrolü arttırdığının gösterilmesi, cerrahi sonrası patolojik olarak kötü prognostik bulguları olan vakalarda lokorejyonel kontrolü arttırmak için ameliyat sonrası RT'ye kemoterapi eklenmesi konseptini geliştirmiştir. Kemoterapinin kullanılması kararı hastanın tedaviyi tolere edebilmesine bağlıdır çünkü tedavi rejiminin ara verilmeden tamamlanması başarı açısından önemlidir<sup>139-142</sup>.

## **2.2.6.2. SUPRAGLOTTİK SCC TEDAVİSİ**

Supraglottik SCC'de boyun metastaz oranları glottik SCC'den daha fazla olduğundan bu lezyonların tedavisinde boyun tedavisi önemli yer tutar. Supraglottik SCC'de N evresi önemli bir prognostik faktördür. Erken evre supraglottik tümörlerde (Evre I ve II) tek bir tedavi modalitesi seçilmesi önerilirken ileri evre (Evre III ve IV) tümörlerde kombine tedavi önerilir.

Session ve ekibinin yaptığı bir derlemede kemoterapi dışındaki tedavi yöntemleri ile tedavi edilmiş olan supraglottik SCC vakaları değerlendirilmiş olup tüm evreler için 5 yıllık hastalıksız sağ kalım oranı %66, evre I için %77, evre II için %74, evre III için %64 ve evre IV için %50 olarak bildirilmiştir. Tedavi modalitelerinin birbirine üstünlüğü olmadığı, larenks koruma oranlarının açık parsiyel larenjektomide %86, primer RT'de %73 olduğu tespit edilmiştir<sup>143</sup>.

Supraglottik SCC tedavisinde son 20-30 yıl içerisinde başarısızlığın artması da bir diğer önemli konudur. 5 yıllık sağ kalım oranları 80'li yıllarda %52,5 olarak bildirilirken 90'lı yıllarda bu oran %47,3'e gerilemiştir<sup>17</sup>. Bu düşüş, T1N0 ve T2N0 supraglottik SCC'lerde en fazla olup T3N0 vakalarda da bir miktar düşme gözlenmiştir. Erken evre lezyonların tedavisinin daha az agresif olan metodlar ile yapılıyor oluşunun bu durumdan sorumlu olduğu düşünülmektedir.

### **Erken Evre Supraglottik SCC Tedavisi**

Erken evre supraglottik SCC tedavisi için en sık tercih edilen tedavi metodu supraglottik parsiyel larenjektomi (SGPL) veya primer RT'dir. Erken evre lezyonlar ve seçilmiş T3 lezyonlarda açık cerrahi veya TLM ile tedavi sağlanabilmektedir.

SGPL cerrahisinin onkolojik geçerliliğinin temeli supraglottik bölgenin embriyolojik gelişimine dayanmaktadır. Supraglottik bölge, glottik ve subglottik bölgeden ayrı olarak gelişir ve bu sebepten dolayı bu bölge lezyonları, glottisin invazyonunu engelleyecek bariz bir anatomik bariyer olmamasına rağmen, supraglottiste sınırlı kalmaya meyilli oluşunu açıklar<sup>144</sup>. SGPL’de ventrikül tabanının üstünde kalan larengeal yapılar eksize edilirken vokal kordlar, aritenoidler, dil kökü ve hyoid korunur. SGPL’nin endike olduğu durumlar T1, T2 ve seçilmiş T3 tümörlerdir. Preepiglottik alanı invaze etmiş olup transglottik yayılım ve/veya vokal kord hareketinin etkilenmediği T3 tümörler SGPL uygun bir seçenektir. Tablo 11’de açık SGPL kontraendikasyonları listelenmiştir.

**Tablo 11: Açık Supraglottik Parsiyel Larenjektomi Kontraendikasyonları<sup>145</sup>**

|  |
|--|
| Genel sağlık durumunun kötü olması                                   |
| İleri yaş  |
| Eşlik eden akciğer hastalığı   |
| Nörolojik hastalıklar  |
| Cerrahi öncesi disfaji veya aspirasyon olması                        |
| Vokal kord hareketinin kısıtlı olması veya vokal kordun fikse olması |
| Tiroid veya krikoid kartilaj invazyonu                               |
| Dil kökünün sirkümvallat papillaların 1 cm’den fazla invaze olması   |
| Dilin derin kaslarının invazyonu                                     |

SGPL için vokal kord hareketliliği önemlidir, ameliyat sonrası aspirasyon oldukça sık görülür. Bu sebeplerden ötürü bu prosedürün seçileceği vakalarda aspirasyonun tolere edilebilmesi için akciğer fonksiyonlarının iyi olması gerekmektedir. Rezeksiyona epiglot lingual yüzü, dil kökü veya aritenoidlerden birisinin dahil edilmesi halinde SGPL, genişletilmiş SPGL olarak adlandırılır<sup>145</sup>.

SPGL sonrasında farengeal kaslara, strep kaslara ve larenks ve farenksin duyu innervasyonuna müdahale edildiğinden özellikle erken postoperatif dönemde yutma olumsuz olarak etkilenir. Güvenilir hava yolu sağlamak ve alt solunum yollarını aspirasyondan korumak için trakeotomi gerekir. Aspirasyonun kalıcı olma riski özellikle 65 yaş üstü hastalarda daha fazladır. Kronik aspirasyon nedeniyle total larenjektomi yapılma oranı %10<sup>146</sup>, trakeotominin kalıcı olma riski %24<sup>147</sup> olarak bildirilmiştir.

Erken evre supraglottik lezyonların lokal kontrolünde SGPL'nin başarı oranları oldukça yüksektir (%80-100)<sup>148-153</sup>. T1'den T3'e kadar olan supraglottik tümörlerde SGPL'nin 5 yıllık lokal kontrol oranı %92,5, lokorejyonel kontrol oranı %90 ve sağ kalım oranı %92,5 olarak raporlanmıştır. Pozitif cerrahi sınır, lenf nodlarında ileri patolojik bulgular gibi sebeplerle %30 adjuvan RT gereksinimi olmuştur. Kartilaj invazyonu veya ekstralarengeal yayılım olan olgular lokal kontrol ve sağ kalımın kötü olduğu vakalar olarak bildirilmiştir<sup>147</sup>. Adjuvan RT sağ kalımı etkilememektedir<sup>153</sup>.

Robbins ve ekibi; uygun vakalarda SGPL, total larenjektomi ve primer RT ile tedavi ettikleri T2 ve T3 supraglottik SCC vakalarını değerlendirmiş olup, 3 yıllık lokal kontrol oranlarını SGPL'de %100, total larenjektomide %91 ve primer RT'de %69 olarak raporlamıştır. Primer RT sonrası kurtarma cerrahisi olarak total larenjektomi yapılmış olgularda lokal kontrol oranlarının %85'e yükseldiğini bildirmişlerdir. 5 yıllık sağ kalım oranları ise SGPL grubunda %78, total larenjektomi grubunda %78 ve RT grubunda %70 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada dikkat edilmesi gereken nokta, SGPL'ye uygun T2 ve T3 tümörlerin diğerlerinden daha sınırlı olduğu ve bu sebeple SGPL başarısının diğer tedavi modalitelerinden daha yüksek olarak belirlenmiş olmasının bu durumun doğal bir sonucu olduğudur<sup>151</sup>.

Erken evre supraglottik SCC'de bir diğer tedavi seçeneği TLM'dir. TLM'nin bu vakalardaki endikasyonları SGPL endikasyonları ile benzer. TLM'nin kontraendike olduğu durumlar; tümörün yetersiz vizüalizasyonu, tümörün büyük damarlara invaze olması ve tümörün uzandığı bölgelerin aspirasyon açısından yüksek risk taşıyan bölgelere invaze olmasıdır<sup>154</sup>. TLM yapılması tercih edilen vakalarda boyna yaklaşım açık cerrahi ile aynıdır, eş zamanlı veya TLM'den birkaç hafta sonra boyun diseksiyonu yapılabilir<sup>155</sup>. Lokal kontrol oranları SGPL ile benzer olup, larenksin ekstrinsik kasları, farengeal kaslar, larenks kartilaj çatısı ve superior larengeal sinirler korunduğundan fonksiyonel etkilenme daha azdır<sup>156</sup>. TLM'nin fonksiyonel açıdan bir başka üstünlüğü de trakeotomi gereksinimi olmaması, yutmanın daha az etkilenmesi, aspirasyonun daha az olması ve faringokütanöz fistül gelişme riskinin daha düşük olmasıdır<sup>157,158</sup>.

TLM yapılmış T1'den T3'e kadar evrenmiş N0 supraglottik SCC hastalarında lokal kontrol oranları T1, T2 ve T3 tümörler için sırası ile %82, %63 ve %77 olarak bildirilmiştir. Larengeal koruma oranları %89, %85 ve %95, hayatta kalma oranları ise %91, %88 ve %81 olarak raporlanmıştır<sup>159</sup>. TLM ile SGPL'nin ses kalitesine olan etkileri ise benzerdir<sup>156</sup>.

Transoral robotik cerrahi (TORC) supraglottik SCC'de tercih edilebilecek bir diğer tedavi metodudur. TORC sonuçları TLM ile oldukça benzerdir<sup>160-162</sup>. TORC özel ekipman gerektiren bir cerrahi yöntem olduğundan her hastada bu ekipmanın kurulması uygun olmayabilir.

Endoskopik rezeksiyon için uygun olan supraglottik larenksi tutan küçük T1 ve T2 tümörler TLM ile RT'ye gerek kalmadan uygun bir şekilde tedavi edilebilirken endoskopik rezeksiyon açısından daha zorlu bölgelerde yerleşmiş olan veya daha büyük T2 ve T3 tümörlerde TLM sonrası RT gerekebilir<sup>163</sup>. Ayrıca TLM ile negatif cerrahi sınır sağlanamayan hastalarda cerrahi sonrası RT'nin lokal kontrolde yetersiz kaldığı gösterilmiştir<sup>164</sup>.

Tek başına RT, cerrahi ile karşılaştırıldığında daha düşük lokal kontrol oranlarına sahiptir. Agrawal ve ekibi bu görüşten yola çıkarak TLM ile primer lezyonun tümör yükünün azaltılmasını takiben adjuvan RT'nin uygulanmasının onkolojik sonuçları iyileştireceğini öne sürmüştür. Bu hipotezle yola çıkarak T1N0'dan T2N1'e kadar evrenmiş olan supraglottik SCC vakalarında prospektif bir çalışma yapmış olup 3 yıllık lokal kontrol oranının %97 olarak bildirmiştir. Sağ kalım oranları ise %88'dir. Fonksiyonel sonuçları muhtemelen adjuvan RT eklendiğinden dolayı diğer TLM serilerinden daha kötü olarak raporlanmıştır. Ayrıca tek bir modalite ile tedavi edilebilecekken multi-modal tedavi şeması önerilmesinin hasta uyumunu zorlaştırdığını da belirtmiştir<sup>165</sup>.

Parsiyel cerrahiye uygun olmayan, tıbbi durumu cerrahiye kaldıramayacak veya cerrahiye kabul etmeyen hastalar için RT önemli bir tedavi seçeneğidir. Cerrahiye ek olarak adjuvan RT veya KRT'nin lokal kontrol oranları tek başına RT'den daha etkili olsa da KRT yapılamayacak olan ve cerrahiye reddeden hastalarda uygulanabilmektedir. RT komplikasyonu olmayan bir tedavi değildir. Disfaji, kronik aspirasyon, larengeal ödem ve kondronekroz, trakeotomi veya total larenjektomi gerektirebilecek RT komplikasyonlarıdır<sup>166</sup>.

N0 olan supraglottik tümörlerde primer RT'nin lokal kontrol oranları T1'de %70, T2'de %68 ve T3-T4'te %54 olarak bildirilmiş olup<sup>167</sup>, bir diğer çalışmada T1,2,3 ve 4'te sırasıyla %100, %85, %64 ve %36 olarak raporlanmıştır<sup>166</sup>. Primer RT sonrası kurtarma cerrahisinde sıklıkla total larenjektomi seçilmiş olup sınırlı vakada SGPL yapılabilir ve bu durumda lokal kontrol oranları sırasıyla %100, %88, %81 ve %57 olarak bildirilmiştir. Lokal kontrolü etkileyen en önemli prognostik faktörler tümör volümünün <6cm<sup>3</sup> olması ve vokal kord hareketliliğidir<sup>168</sup>.

## İleri Evre Supraglottik SCC Tedavisi

İlerlemiş primer supraglottik tümörler (yani T3 veya T4) geleneksel olarak total larenjektomi, bilateral boyun diseksiyonu ve postoperatif RT ile tedavi edilmektedir. Bununla birlikte, larengeal koruma, hastaların yaşam kalitesini artırma amacıyla larengeal kanser tedavisinde önemli bir amaç haline gelmiştir<sup>169</sup>. Bu ilerlemiş lezyonlar için terapötik seçenekler şu anda bilateral boyun diseksiyonu ile cerrahi eksizyon (toplam larenjektomi veya seçilmiş olgularda parsiyel larenjektomi), ardından adjuvan RT veya eş zamanlı KRT; primer RT, eş zamanlı KRT olup son iki seçenekte kurtarma cerrahisi (sıklıkla total larenjektomi) şeklindedir<sup>170</sup>.

1991 yılında yapılan bir çalışmada cerrahi olmayan organ koruyucu tedavi yöntemleri karşılaştırılmıştır. Eşzamanlı KRT grubunda, tek başına indüksiyon kemoterapisi ve tek başına RT kollarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek lokorejyonel kontrol oranları (% 78) ve larengeal koruma (% 88) sağlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları, eş zamanlı KRT'nin, T2, T3 ve kartilaj invazyonu olmayan küçük hacimli T4 tümörleri için standart cerrahi dışı organ koruma protokolü haline gelmesine neden olmuştur<sup>130</sup>.

İleri evre primer tümörlerin cerrahi tedavisinde total larenjektomi, SKPL, genişletilmiş SKPL veya TLM tedavi seçenekleri arasındadır. Seçilmiş olgularda SKPL primer tedavi olarak seçilebileceği gibi primer RT sonrası nükslerde kurtarma cerrahisi olarak da tercih edilebilir<sup>171</sup>. SKPL'de her iki vokal kord, bant ventrikül, her iki paraglottik alan, tiroid kartilajın tamamı ve epiglot eksize edilir. Rezeksiyona bir aritenoid dahil edilebilir fakat larenksin fonksiyonel olabilmesi için en az bir krikoaritenoid ünite korunmalıdır.<sup>172</sup> Hyoid ve krikoid kartilaj korunur ve cerrahi defekt krikohyoidopeksi (KHP) olarak adlandırılan, krikoid kartilajın hyoid ve dil köküne asılması ile onarılır. KHP ile birlikte yapılan SKPL endikasyonları ve kontraendikasyonları Tablo 12'de özetlenmiştir.

**Tablo 12: İleri Evre Supraglottik SCC’de SKPL Endikasyon<sup>172</sup> ve Kontraendikasyonları<sup>145,173</sup>**

| ENDİKASYON  | KONTRAENDİKASYON  |
|---|---|
| SGPL’nin endike olmadığı T2 supraglottik tm<br>- Vokal kord, ventrikül tabanı veya anterior komissür uzanımı<br>VE/VEYA<br>- Vokal kord hareket kısıtlılığı | - Genel durum bozukluğu<br>- Kötü akciğer fonksiyonu<br>- Krikoaritenoid eklem veya krikoid kartilaj invazyonu<br>- Posterior komissür veya subglottik uzanım |
| Transglottik veya supraglottik T3 tm<br>- Vokal kordun fikse<br>VE/VEYA<br>- Preepiglottik alanın invazyonu   | - Hyoid kemik invazyonu<br>- Tiroid kartilaj dış perikondriumuna invazyon   |
| Transglottik veya supraglottik T4 tm<br>- Tiroid kartilaja sınırlı invaze, dış perikondriumu geçmeyen<br>VEYA<br>- Ekstralarengeal yayılım olmayan          | - Ekstralarengeal yayılım   |

SKPL’nin onkolojik sonuçlarına bakılacak olursa 5 yıllık sağ kalım oranları %67-95 ve lokal kontrol oranları %88-95 arasında bildirilmiştir<sup>172,174</sup>. Rekürrens durumunda kurtarma cerrahisi olarak total larenjektomi önerilir. SKPL sonrası fonksiyonellik genellikle iyidir. Tüm hastalarda trakeotomi ve nazogastrik beslenme gerekli olup pek çok hastada bu durum geçicidir<sup>171,175</sup>. Bu prosedürün en önemli dezavantajı ses kalitesinin kötü olmasıdır<sup>172</sup>. Aspirasyonun kalıcı olması halinde total larenjektomi gerekebilir<sup>117,171</sup>.

Dil köküne derin invazyon veya kartilaj destrüksiyonu olmayan T3 ve T4a tümörlerin organ koruyucu tedavi için cerrahi veya cerrahi olmayan tedavi seçenekleri mevcuttur. Cerrahi olmayan organ koruma tedavisi eş zamanlı KRT iken cerrahi tedavi parsiyel larenjektomiye uygun vakalarda parsiyel larenjektomi ve cerrahi sonrası adjuvan RT’dir. Primer cerrahi sonrasında adjuvan RT veya eş zamanlı KRT gerekebilir. Cerrahi veya cerrahi olmayan organ koruyucu yöntemler ile primer tedavi sonrası rekürrenslerde kurtarma cerrahisi olarak total

larenjektomi gerekebilir. Kartilajın bariz destrükte olduğu ve/veya ekstralarengeal yayılım olan T4 tümörlerin ilk tedavisinde total larenjektomi önerilir.

### **Supraglottik SCC'de Boyun Tedavisi**

Supraglottik SCC'de klinik ve okült reyonel metastaz oranı yüksek olup, sıklıkla II, III ve IV. boyun seviyeleri tutulur. Klinik N0 supraglottik tümörlerde, T1 tümör hariç boynun tedavi edilmesi şarttır. Boyna yönelik planlanacak olan tedavi yöntemi primer tümörün tedavisinde tercih edilecek yöntemeye göre cerrahi veya RT'dir. Erken evre T1, T2 tümörlerde cerrahi veya primer RT, tek modalite olarak primer alanı ve boynu tedavi etmede kullanılabilir. Primer tümörün parsiyel larenjektomi ile tedavi edildiği olgularda boyun diseksiyonu endikasyonları değişmez. İleri evre T3 ve T4 tümörlerde tedavide kombine tedavi sıklıkla gereklidir.

Supraglottik SCC'de N0 boyun için standart cerrahi tedavi seviye II-IV'ün bilateral selektif boyun diseksiyonudur. I ve V. boyun bölgelerine metastaz çok nadirdir<sup>60,176,177</sup>. Klinik N0 ve N1 hastalıkta selektif boyun diseksiyonu (Level II,IV arası), kapsamlı boyun diseksiyonu (Level I-V arası) kadar etkilidir<sup>178</sup>.

N0 supraglottik ve glottik tümörlerin boyun metastazları incelendiğinde level IIB ve IV'ün nadiren tutulduğu tespit edilmiş olup, bu durumda daha selektif olarak level IIA ve III'ün diseksiyonunun yeterli olacağı bildirilmiştir<sup>179</sup>. Fakat klinik N0 supraglottik SCC'de level I'e okült metastaz oranını %82 olarak bulan bir çalışma olduğu da unutulmamalıdır. Bu çalışmada 57 klinik N0 hasta değerlendirilmiş olup, 34 hastaya selektif boyun diseksiyonu yapılmış, 23 hasta ise gözlemlenmiştir. Boyun diseksiyonu yapılmış olan hastaların %30'unda lenf nodu pozitifliği tespit edilmiş olup, takibe alınan 23 hastaların %30'unda reyonel boyun metastazı saptanmıştır. Klinik N0 olup cerrahi sonrası pozitif lenf nodu metastazı tespit edilen 17 hastanın tamamında level II tutulumu, 14'ünde (%82) level I tutulumu saptanmıştır<sup>59</sup>.

Primer tedavide parsiyel larenjektomi tercih edilen klinik N0 olgularda level II-IV arası selektif boyun diseksiyonu önerilir. N2 ve N3 olan vakalarda, tutulan boyun tarafına genişletilmiş level I-V arası boyun diseksiyonu ve karşı boyun klinik N0 ise level II-IV arası selektif boyun diseksiyonu yapılması önerilir. Primer tedavi cerrahi dışı ise boynun her iki tarafına da RT uygulanması gerekir.

### 2.2.6.3. SUBGLOTTİK SCC TEDAVİSİ

Subglottik SCC tedavisinde total larenjektomi ve bunu takiben RT kullanılmaktadır. Hemen hemen tüm vakalarda larengeal çatı invazyonu olduğundan total larenjektomi gerekir. Krikoid kartilaj invazyonunun sıklıkla eşlik etmesi sebebiyle, krikoid kartilajın *parsiyel* rezeksiyonu sonrası larengeal rekonstrüksiyonun zor olduğundan parsiyel larenjektomi tercih edilmez. İpsilateral tiroidektomi ve paratrakeal lenf nodu rezeksiyonu da gereklidir. Trakeal uzanım olması halinde geniş trakeal rezeksiyon ve manubriumun çıkarılması, posteriorda özefagusa uzanım olması halinde servikal özefagusun rezeksiyonu gerekebilir. Lenf nodu metastazı veya ekstralarengeal uzanım olan vakalarda cerrahi sonrası üst mediasteni de içerecek şekilde adjuvan RT veya eş zamanlı KRT gerekebilir. Adjuvan RT ve eş zamanlı KRT peristomal rekürrens ihtimalini azaltır<sup>54</sup>.

Agresif tedaviye rağmen sağ kalım kötüdür. Subglottik SCC'nin tedavisinde primer RT sonrası sağ kalım %36, cerrahi sonrası %42<sup>180</sup> iken mortalite %44'tür<sup>181</sup>. Subglottik SCC vakaları sıklıkla ileri evrede tanı aldığından prognozu kötüdür. Erken evrede tespit edilmesi oldukça güç olup saptanması halinde primer RT kullanılabilir fakat bunun için yeterli literatür bilgisi mevcut değildir.

### 2.2.7. LARENKS SCC'DE PROGNOZ, PROGNOSTİK FAKTÖRLER

Larenks SCC'nin 5 yıllık sağ kalım oranı %64 iken larenksin alt bölümlerinde göre bu oranlar supraglottik SCC'de %47, glottik SCC'de %79, subglottik SCC'de %30-50 arasında bildirilmiştir<sup>17,182</sup>. Sağ kalımı etkileyen hastalığa ve hastaya bağlı pek çok faktör vardır ve Tablo 13'te özetlenmiştir.



**Tablo 13: Larenks SCC’de Prognostik Faktörler**

| Hastaya Bağlı Özellikler          | Hastalığa Bağlı Özellikler                         |
|-----------------------------------|--|
| Genel sağlık durumu               | Klinik Özellikler                                  |
| Eşlik eden komorbiditeler         | - Klinik evre                                      |
| Yaş                               | - Primer tümörün kaynaklandığı bölge               |
|                                   | - Vokal kord hareketinin bozulması veya fiksasyonu |
|                                   | - Uzak metastaz                                    |
|                                   | Radyolojik Özellikler                              |
| Performans skoru                  | - Anterior komissür tutulumu                       |
|                                   | - PEA tutulumu                                     |
| Hemoglobin düzeyi                 | - Larengeal kartilaj invazyonu                     |
|                                   | - PET/BT’de FDG tutulum düzeyi                     |
|                                   | Histopatolojik Özellikler                          |
| Sigara kullanımı                  | - Ekstranodal invazyon                             |
| Alkol kullanımı                   | - Tümörün gradelemesi                              |
| Kilo kaybı (Son 6 ayda $\geq$ %5) | - Tümörün invazyon paterni                         |
|                                   | - Sınır pozitifliği                                |
| Depresyon                         | - Perinöral/lenfovasküler invazyon                 |
|                                   | - Kartilaj invazyonu                               |
|                                   | - Tümörün anormal genetiği                         |

Larenks kanserinde en önemli prognostik prediktör klinik evredir. İleri T ve/veya N evreleri, sağ kalımda azalma ile direk ilişkilidir<sup>183,184</sup>. Sağ kalımın ön görülmesinde N evresi, T evresine göre daha belirleyicidir<sup>185</sup>. N negatif hastaların sağ kalım oranları N pozitif hastalardan daha yüksektir<sup>184</sup>. Servikal lenf nodu metastazı olan vakalarda histopatolojik olarak ekstranodal invazyonun olması prognozu daha da kötü etkiler<sup>186,187</sup>. En kötü prognostik faktör uzak metastaz olup 5 yıllık sağ kalım oranı %10’dur<sup>63</sup>.

Primer tümörün kaynaklandığı bölge ikinci en önemli prognostik faktördür. Glottik SCC en iyi prognoza sahipken subglottik SCC en kötü prognoza sahiptir<sup>17,182</sup>. Primer RT’de lokal kontrol tümör hacmi arttıkça güçleşir<sup>188,189</sup>. Vokal kord fiksasyonu tüm larenks SCC alt gruplarında tümör evresini T3’e yükseltir. Vokal kord hareketinin kısıtlandığı T2 tümörlerin primer RT ile lokal kontrolü, vokal kord hareketinin normal olduğu T2 tümörlere göre daha

güçtür<sup>108</sup>. Primer RT ile takip edilen T2b ve T3 tümörlerde vokal kord hareketliliğinin geri dönmemesi hemen her zaman lokorejyonel rekürrensi gösterir<sup>190</sup>.

BT veya MR'da anterior komissür, preepiglottik alan veya larengeal kartilaj invazyonu gibi larenksin belirli bölge veya yapılarına tümör uzanımı görülmesi veya tiroid kartilaj tutulumu tespit edilmesi, lokal kontrolün zor olduğu göstergeleri arasındadır<sup>191-195</sup>. BT, MR veya PET ile tümör hacminin ölçülmesi lokal kontrol için önemli bir belirteç olur fakat tümör hacmi her zaman bağımsız bir prediktör değildir<sup>195-198</sup>.

PET taramasında FDG tutulum değerleri ile prognoz arasında yakın ilişki olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalara göre tedavi öncesi PET taramasında primer tümörün FDG tutulumunun yüksek olduğu tümörlerin lokal kontrolü ve hastaliksız sağ kalım oranları daha kötü olarak bulunmuştur<sup>199,200</sup>. Lokal kontrolün başarısını ön görebilecek standardize edilmiş değerlendirme kriterleri hiçbir görüntüleme yöntemi için mevcut değildir<sup>68</sup>.

En önemli histopatolojik prognostik faktör lenf nodu metastazı olan olgularda ektranodal invazyon olmasıdır. ENİ varlığı tüm baş boyun öblgesinden kaynaklanan SCC'lerde olduğu gibi larenks SCC'de de sağ kalımı düşüren en önemli bulgudur<sup>186,187</sup>.

Tümörün histolojik tipi de önemli bir prognostik faktördür. SCC'nin pek çok alt tipi vardır ve herbirinin biyolojik davranışı farklıdır. Verrüköz SCC daha az agresif ve iyi prognozlu iken bu durum adenoskuamöz karsinom için tam tersidir.

Tümörün histolojik gradelemesi<sup>201,202</sup> (iyi diferansiye, orta diferansiye veya az diferansiye), invazyon paterni<sup>49,203</sup> (infiltratif veya ekspansif), perinöral ve/veya lenfovasküler invazyon varlığı<sup>204</sup> lokal kontrol ve sağ kalımı etkilemektedir. Primer tümör rezeksiyonu sonrası sınır pozitifliği lokal rekürrens için önemli bir risk faktörüdür<sup>205,206</sup>.

DNA incelemesinin prognostik olarak kullanımı tartışmalı olsa da nodal metastaz ve RT sonrası sağ kalımı ön görmede önemli bir belirteç olabileceğine dair çalışmalar mevcuttur<sup>207</sup>. Anormal genotipe sahip tümörlerin RT sonrası lokal rekürrens riskinin arttığı gösterildiği çalışmalar<sup>208</sup> mevcut olsa da tam tersini gösteren çalışmalar da mevcuttur<sup>209</sup>. Kanser gelişiminde en sık mutasyona uğrayan gen *TP53*'tür fakat larenks kanserindeki prognostik yeri tartışmalıdır<sup>210-212</sup>.

Epidermal growth faktör reseptörünün (EGFR) aşırı ekspresyonu, hastalığın agresif seyretmesi, lenf nodu metastazı ve sağ kalımı etkileyen bir belirteçtir<sup>212</sup>. EGFR'nin aşırı eksprese edildiği tümörlerin RT'ye daha dirençli olduğu ve lokal kontrolünün daha zor olduğu gösterilmiş olup<sup>213</sup>, tümörün EGFR durumunun RT ve KT'ye olan duyarlılığını ön görmede kullanılabileceği belirtilmiştir<sup>212</sup>. Vasküler endotelial growth faktör pozitifliği larenks SCC için RT ile tedavi edilen hastalarda sağ kalımı artması ile ilişkilendirilmiştir<sup>214</sup>.

Siklin D1 ve D3'ün aşırı ekspresyonu hastaliksız sağ kalımı ön görmede önemli bir belirteç olabilir. Larenks SCC'de siklinD1/D3 ekspresyon durumuna göre prognostik gruplara ayrılmış olan hastalarda her iki siklinin birlikte eksprese edildiği vakaların en kötü prognoza sahip olduğu rapor edilmiştir<sup>215</sup>. Cyclooxygenase-2 (COX-2), galectin-3 gibi epitelyal diferansiyasyon belirteçleri de prediktif değere sahip olabilir. COX-2'nin düşük ekspresyonu daha agresif biyolojik davranışlı tümörler ile ilişkili bulunmuş olup galectin-3 ekspresyonu sağ kalımın daha iyi olması ile ilişkilendirilmiştir<sup>212</sup>.

Hastanın kişisel özellikleri prognozu etkilemektedir. Genel sağlık durumu, eşlik eden komorbiditelerin varlığı, yaş ve performans durumu prognoz açısından oldukça önemlidir. Larenks kanseri hastalarında eşlik eden komorbiditenin olması bağımsız bir prognostik faktördür<sup>203,216</sup>. Larenks SCC ileri yaşta (>65) daha kötü prognozludur<sup>184,201</sup>. Karnofsky Performans Skalası'nda performans düzeyi daha yüksek olan hastalarda sonuçlar çok daha iyidir<sup>217,218</sup>. Cinsiyetin prognoza etkisi olmadığı bildirildiği gibi<sup>201,217</sup>, kadın hastalarda prognoz daha kötü seyrettiğini rapor eden çalışmalar da mevcuttur<sup>219,220</sup>. Hemoglobin düzeyleri normal olan, larenks SCC ile tedavi edilen hastaların, artmış sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir<sup>221</sup>.

#### **2.2.8. LARENKS SCC'DE TEDAVİ SONRASI TAKİP**

Larenks SCC'nin tedavi sonrası takibinin amaçları; hastalığın rekürrensini tespit etmek, ikincil primer tümörleri saptamak, konuşma ve yutmanın rehabilitasyonuna yardımcı olmak, yeterli beslenmenin sağlandığından emin olmak ve tedavi sonrası gelişebilecek kronik ağrı gibi yan etkilerin etkili bir şekilde tedavisini sağlamaktır. Düzenli takipler esnasında yalnızca %2 hastada asemptomatik rekürrens tespit edilmiş olup, bu asemptomatik rekürrenslerin takipler esnasında saptanmasının sağ kalıma etkili olmadığı gösterilmiştir<sup>222</sup>.

Tedavi sonrası fizik muayenenin, ilk bir yılda 1-3 ayda bir, ikinci yılda 2-4 ayda bir, üç, dört ve beşinci yıllarda 4-6 ayda bir ve sonrasında 6ay veya yılda bir sıklıkta olması önerilmektedir<sup>223</sup>. RT veya açık larengeal cerrahi yapılmış olan hastalarda, RT ve geniş larengeal ve tiroid cerrahi tiroid fonksiyonlarını azaltacağından, her altı ayda veya on iki ayda bir tiroid fonksiyon testleri yapılmalıdır. Hipotiroidizm tedaviden yıllar sonra gelişebilir ve depresyon veya letarji haricinde bulgu vermeyebilir. Hipotiroidi riski RT sonrası %20, larenjektomi ve ipsilateral tiroidektomi sonrası %50, bu iki tedavinin kombine edildiği durumlarda ise %65'ten fazladır<sup>224</sup>.

### 2.3. MİKRO-RNA GENEL BİLGİLER

MikroRNA'lar (miRNA'lar), bölünme veya translasyonel baskılama için mRNA'ları hedefleyerek, hayvanlarda ve bitkilerde önemli düzenleyici rol oynayabilen endojen 22 nükleotid (nt) içeren RNA'lardır. miRNA'lar çok hücreli organizmalarda gen düzenleyici molekül sınıfından biridir ve muhtemelen birçok protein kodlayan genin üretimini etkilemektedir.

Victor Ambros ve ekibi, *C. elegans* larva gelişiminin zamanlamasını kontrol ettiği bilinen lin-4 geninin bir proteini kodlamadığını bunun yerine bir çift küçük RNA ürettiğini keşfetti<sup>225</sup>. Bir RNA yaklaşık 22 nt uzunluğunda, diğeri yaklaşık 61 nt uzunluğunda olduğu ve daha uzun olanın, daha kısa olanın öncüsü olduğu tahmin edildi. Ambros ve Ruvkun laboratuvarları daha sonra bu lin-4 RNA'larının lin-14 geninin 3'UTR'sindeki çoklu bölgelere antisens tamamlayıcılık gösterdiğini fark etti<sup>225,226</sup>. Bu tamamlayıcılık, lin-14 gen ürünü tarafından lin-14'ün baskılanmasına aracılık etmek için daha önce önerilmiş olan 3' UTR bölgesine karşılık gelmekteydi<sup>227</sup>. Ruvkun laboratuvarı, lin-4'ün lin-14 mRNA seviyelerinde gözle görülür bir değişiklik olmadan, LIN-14 proteini miktarını önemli ölçüde azalttığını gösterdi. Bu bulgular, lin-4 RNA'ların, ilk larva aşamasının hücre bölümlerini tetikleyen düzenleyici yolun bir parçası olarak lin-14 translasyonunu düzenlemek için lin-14 3' UTR ile eşleştiği modeli destekledi<sup>225,226</sup>.

Günümüzde, daha kısa olan lin-4 RNA, mikroRNA'lar veya miRNA'lar adı verilen, düzenleyici RNA sınıfının kurucu üyesi olarak kabul edilmektedir<sup>228-230</sup>. miRNA'ya yönelik gen düzenlemesinin genişliği ve önemi, daha fazla miRNA ve bunların düzenleyici hedefleri ve işlevleri keşfedildikçe ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda keşfedilen miRNA fonksiyonları arasında hücre çoğalmasının kontrolü, hücre ölümü ve sineklerde yağ metabolizması,

nematodlarda nöronal şekillenme, memelilerde hematopoetik hücre farklılaşma modülasyonu ve bitkilerde yaprak ve çiçek gelişiminin kontrolü bulunmaktadır<sup>231-238</sup>.

### **mikroRNA Genleri**

Lin-4 RNA'nın keşfedilmesinden sonraki yedi yıl boyunca, bu tip düzenleyici RNA'nın genomisi basit göründü: nematodların ötesinde lin-4 benzeri RNA'lar olduğuna dair hiçbir kanıt yoktu ve nematodlarda benzer kodlayıcı olmayan RNA'lara rastlanmadı. Bunların hepsi, *C. elegans* heterokronik yolundaki bir başka gen olan let-7'nin, ikinci bir 22 nt uzunluğundaki düzenleyici RNA kodladığı keşfedildiğinde değişti. Let-7 RNA, geç larvadan yetişkin hücreye geçişi indüklemek için hareket ettiği, aynı şekilde lin-4 RNA'nın, ilk larva aşamasından ikinciye ilerlemeyi indüklemek için gelişme aşamasında daha erken hareket ettiği gözlemlendi<sup>239,240</sup>. Ayrıca, let-7 geninin homologları, insan ve sinek genomlarında tanımlandı ve let-7 RNA'sının kendisi, insanda, *Drosophila*'da ve on bir başka hayvanda tespit edildi<sup>241</sup>.

Gelişimin zamanlamasını kontrol etmedeki ortak rolleri nedeniyle, lin-4 ve let-7 RNA'ları küçük geçici RNA'lar (stRNA'lar) olarak adlandırılmıştır<sup>241</sup>. Sonraki bir yıl içerisinde sinek, solucan ve insan hücrelerinden ufak RNA klonlayan üç laboratuvar, kodlanmayan bu RNA'lar için 100'den fazla gen (*Drosophila*'da 20, insanda 30 ve solucanlarda yaklaşık 60 tane) tespit etti<sup>228-230</sup>. Bu genlerin RNA ürünleri, lin-4 ve let-7 stRNA'larına benziyordu. Potansiyel olarak bir kök halka öncülünün bir kolundan işlenen 22 nt endojen eksprese edilen RNA'lar oldukları ve evrimsel süreçte son derece iyi olarak korundukları gösterilmiştir. Ancak, lin-4 ve let-7 RNA'larının aksine, yeni tanımlanan 22 nt RNA'ların birçoğunun, farklı gelişim aşamalarında eksprese edilmediği ve bunun yerine, spesifik hücre tiplerinde eksprese edilme olasılığının daha fazla olduğu tespit edildi. Dolayısıyla, mikroRNA terimi, benzer özelliklere sahip ancak bilinmeyen fonksiyonları olan stRNA'lar ve diğer tüm küçük RNA'lar adlandırmak için kullanılmaya başlandı<sup>228-230</sup>. Giderek artan klonlama çalışmaları, memelilerde, balıklarda, solucanlarda ve sineklerde sayısız miRNA genini ortaya çıkardı<sup>242-252</sup>. miRNA'ları kataloglamak ve yeni tanımlanan genlerin isimlendirilmesini kolaylaştırmak için bir kayıt sistemi oluşturuldu<sup>253</sup>.

*C. elegans* lin-4 ve let-7 gibi, çoğu miRNA genlerinin ilgili oldukları genlerden oldukça uzak olan genom bölgelerinden geldiği, bağımsız transkripsiyon bölgelerinden kaynaklandıklarını düşündürmüştür<sup>228-230</sup>. Bununla birlikte miRNA'ların azımsanmayacak bir kısmının (insan mi-RNA genlerinin yaklaşık dörtte biri) pre-mRNA kodlayan genlerin intron

bölgelerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu düzen miRNA ve proteinin koordineli ekspresyonu mekanizmasını mantıklı bir şekilde açıklar. miRNA'lar ve kaynaklandıkları mRNA'ları arasındaki korunmuş ilişki, düzenleyici mekanizmaları açıklamada yararlı olabilir. Bu korumalı ilişkinin çarpıcı bir örneği, hem böceklerde hem de memelilerde hnRNP K'nin intronunda bulunan mir-7'dir<sup>247</sup>.

Diğer miRNA genleri genom içerisinde belli bir düzenle kümelenecek şekilde düzenlenmiş olup, ekspresyon paternlerinin multi-sistronik primer transkript paterni ile transkripsiyon gösterdiklerini düşündürmektedir<sup>228,229</sup>. Solucan ve insan miRNA genlerinin çoğu izole ve kümelanmemiş olup *Drosophila* genomunda tanımlanmış olan miRNA genlerinin yarısından çoğu kümelanmış haldedir<sup>229,251,252</sup>. Genomda kümelanmış miRNA'lar her zaman olmasa da, çoğu zaman birbirleriyle ilişkilidir; ve birbiri ile miRNA'lar bazen, her zaman değil, kümelanmış haldedir<sup>228,229</sup>. *C. elegans* lin-4 ve let-7'nin ortologları sinek ve insan genomlarında kümelanmış haldedir ve bazen aynı primer transkriptten birlikte eksprese edilir. Bu, nematodlarda lin-4'ün let-7'den genomik ayrılmasının solucan soyuna özgü olabileceğini düşündürmektedir<sup>247,254,255</sup>. Bu örnek, kümelanmış genlerin belirgin bir dizi homolojisine sahip olmasada, fonksiyonel ilişkileri paylaşabilme ihtimalini göstermektedir.

HOX kümesi içerisinde bulunan miRNA gen kümeleri ilginç genomik konumlara örnektir. Bunlardan mir-10 geni, böceklerin Antennapedia kompleksinde ve memelilerin iki HOX kümesinde bulunan ortolog yerlerinde, mir-iab-4 geni ise böcek Bithorax kümesindedir<sup>243,247</sup>. HOX kümelerindeki diğer genlerinin rolleri düşünüldüğünde, HOX miRNA'ların hayvansal gelişimin düzenlenmesinde önemli rol oynayabilecek adaylar oldukları düşünülmektedir. Bir diğer ilginç bölge, insanda mantle hücreli lenfoma ve B hücreli kronik lenfositik lösemide en yaygın anormalliğin tespit edildiği ve bu sebeple tümör supresör bir gen kodladığı düşünülen 13. kromozomda yer alan mir-15a-mir-16 kümesidir<sup>228,256</sup>. Birbiri ile yakın ilişkili hayvan türleri olan, insan ve fare veya *C. elegans* ve *C. briggsae*'nde, miRNA genlerinin neredeyse tamamının korunduğu klonlama çalışmalarında gösterilmiştir<sup>243,251,252</sup>. Birçoğu, hayvan soyları arasında daha geniş ölçüde korunmaktadır<sup>243,246,247,251</sup>. Örneğin, *C. elegans* miRNA'larının yaklaşık üçte birinin insan genomundaki homologları kolaylıkla tanınabilmektedir<sup>251</sup>. Uzak soyları karşılaştırırken, gen ailelerinin kayda değer bir şekilde genişlemesi veya küçülmesi beklenir, buna en çarpıcı örnek, *C. elegans*'ta dört ve insanda en az 15, fakat sadece *Drosophila*'da bir tane tanımlanmış üyesi olan let-7 ailesidir<sup>241,247,251,257</sup>.

## miRNA Ekspresyonu

Birçok miRNA'nın ilginç bir ekspresyon paterni vardır. Örneğin, *C. elegans* lin-4 ve let-7 RNA'larının paralogları ve ortologları gelişim esnasında, stRNA'lar gibi işlev görebilir ve evre özgün olarak eksprese olurlar<sup>229,241,242,251,254</sup>. Diğer ilginç örnekler arasında, esasen memeli kalbinde bulunan miR-1; öncelikle karaciğerde bulunan miR-122; temel olarak fare kemik iliğinin granüositleri ve makrofajlarında bulunan miR-223; *C. elegans* embriyosunda bulunan mir-35-mir-42 kümesinin miRNA'ları ve fare embriyonik kök hücrelerinde eksprese edilen fakat farklılaşmış hücrelerde olmayan mir-290-mir-295 kümesi bulunmaktadır<sup>229,230,234,242,249</sup>. Expression array teknolojisi, miRNA'ları incelemek için uyarlanmıştır ve memeli beyninin farklı gelişim aşamalarında veya bölgelerinde farklı ekspresyon paternlerini ortaya koymuştur<sup>258</sup>. Bütün bunlar, farklı genler ve ekspresyon paternlerinin, gelişimin her aşamasındaki her metazoan hücre tipinin ayrı bir miRNA ekspresyon profiline sahip olabileceğini ve bu şekilde transkripsiyonun "mikro yönetimi" mümkün olabileceği düşünülmektedir.

miRNA ekspresyonunun bir başka dikkat çekici yönü, belirli hücrelerdeki belirli miRNA'ların çokluğudur. Örneğin, miR-2, miR-52 ve miR-58'in her biri yetişkin solucanda, hücre başına ortalama 50.000'den fazla molekülde bulunur. Bu miRNA'lar spliceosomeun U6 snRNA'sından daha fazladır. Ekspresyondaki bu fazlalığın transkripsiyonu arttırdığı mı yoksa bozunmayı mı yavaşlattığı henüz bilinmemektedir. Bazı miRNA'lar çok daha düşük seviyelerde eksprese edilir. Örneğin, miR-124 erişkin solucanlarda hücre başına ortalama 800 molekül bulunur<sup>230</sup>. Bu düşük ortalama seviye (hala tipik mRNA'nınkinden daha yüksek olsa da), birçok hücrede düşük ekspresyondan veya sadece birkaç hücrede yüksek ekspresyondan kaynaklanıyor olabilir. miR-124'ün faredeki ortologununun neredeyse yalnız beyinde eksprese edildiği bulgusu, bu açıklamayı desteklemektedir<sup>242</sup>.

## miRNA Transkripsiyonu

Bazı miRNA'lar intronlarda yer alır, kaynaklandıkları genin pre-mRNA'ları ile düzenleyici elemanlarını ve primer transkriptlerini paylaşmaları muhtemeldir. Diğer miRNA genleri ise muhtemelen kendi promotörlerinden transkribe olurlar, primer transkriptleri tam olarak tanımlanmamıştır. Bu primer miRNA transkriptleri, pri-miRNA'lar olarak adlandırılmaktadır, pri-miRNA'lar, tanımlanmış olan miRNA'lardan daha uzundur. pri-miRNA'ların tek bir primer transkriptten okunduğu düşünülmektedir ve bunlar veri tabanında

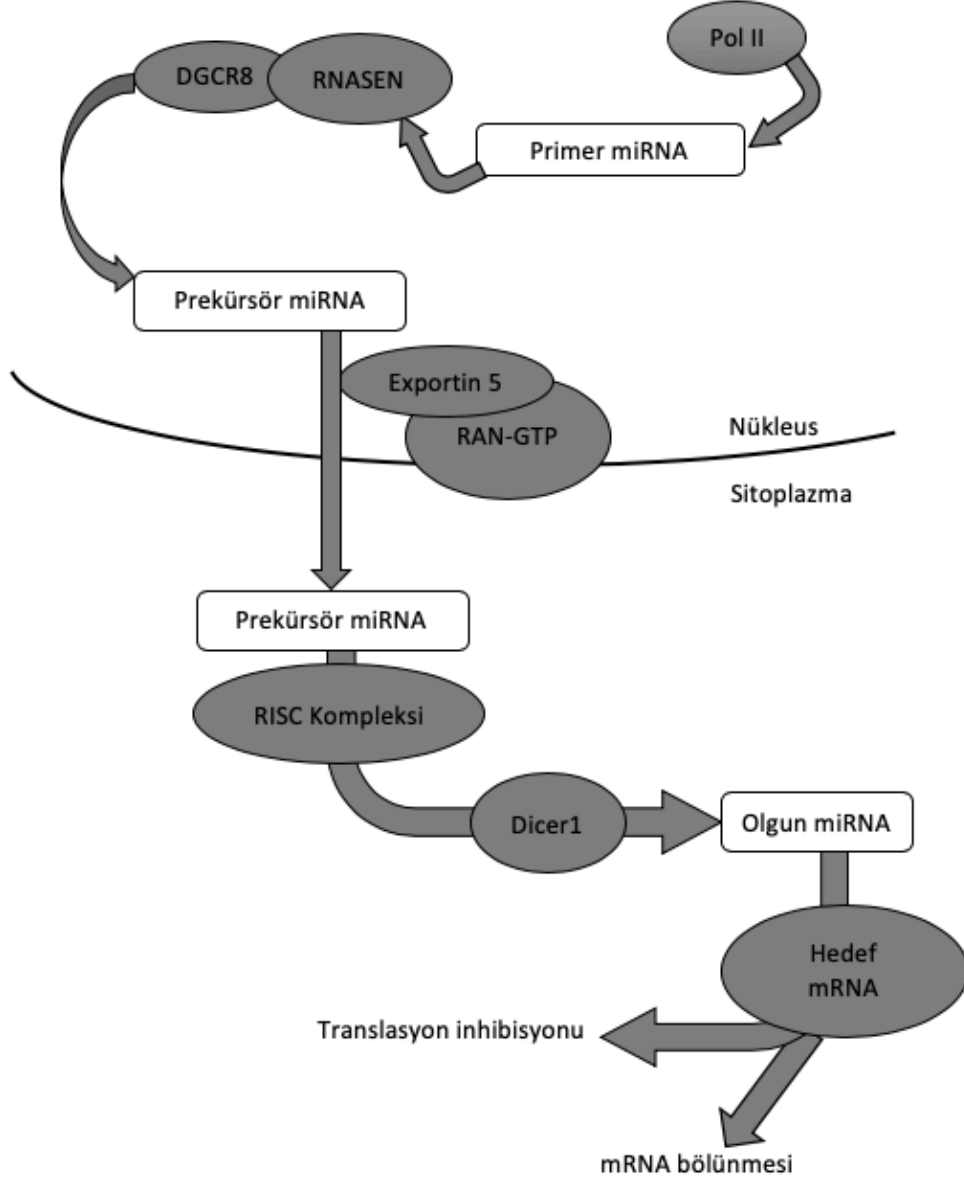
yer alan miRNA'larla eşleşme göstermektedir<sup>235,242</sup>. RT-PCR deneylerinde daha uzun olan pri-miRNA fragmanları amplifiye edilerek varlıkları gösterilmiştir<sup>247,259</sup>.

Pri-miRNA transkripsiyonunda rol oynayabilecek iki RNA polimeraz, pol II ve pol III, aday gösterilmiştir. Pol II, mRNA'ları ve kodlayıcı olmayan RNA'ları (küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) ve küçük nükleer RNA'ları (snRNA'ları dahil) ) RNA'ları üretirken, pol III, daha kısa kodlayıcı olmayan RNA'ların bazılarını (tRNA'ları, 5S ribozomal RNA ve U6 snRNA) üretir. Protein kodlayan konak genlerin intronlarından işlenen miRNA'ları pol II transkribe eder. Diğer pek çok miRNA'nın, çoğu metazoan miRNA geni klasik poliadenilasyon sinyaline sahip olmamasına rağmen, pol II ürünü olduğunu dolaylı yoldan kanıtlayan gözlemler mevcuttur;

- 1- pri-miRNA'lar pol III'ün bilinen tipik transkriptlerinden çok uzundur,
- 2- Bu pri-miRNA'lar pol III transkripsiyonunu erkenden sonlandırdığı bilinen uridin kalıntıları içermektedir,
- 3- Pek çok miRNA gelişim sürecinde farklı eksprese edilir. Bu durum pol II ürünleri için geçerli iken pol III ürünleri için geçerli değildir,
- 4- Hedef proteine bağlanma şeklinden dolayı mi-RNA primer transkriptinin pol II transkriptleri ile kaplandığı düşünülmektedir<sup>260</sup>.

Her ne kadar bu gözlemler birçok miRNA'nın pol II transkriptleri olduğunu gösterse de, tıpkı snRNA'ların çoğunun pol II ürünleri olduğu ama hepsinin olmadığı gibi, bazı miRNA'lar da pol III transkriptleri olabilir. miR-142'nin ektopik ekspresyonu ve pol III promoterdan üretilen diğer miRNA'lar ve bu miRNA'ların in vivo olarak etkinliği de gösterilmiştir<sup>234</sup>.





**Şekil 4: miRNA biyogenez adımları; 1- Nükleusta, uzun primer prekürsör miRNA (pri-miRNA) sentezlenir, 2- Uzun pri-miRNA, ribonükleaz 3 (RNASEN) ve DiGeorge kritik bölge 8 protein (DGCR8)'den oluşan nükleer mikroprosesör kompleksi ile prekürsör miRNA (pre-miRNA)'ya bölünür, 3- Nükleustaki pre-miRNA guanozin trifosfat-bağlayan nükleer protein Ran (RAN) (Ran-GTP) ile nükleustan sitoplazmaya taşınır, 4- Sitoplazmaya taşınmış olan pre-miRNA, RNA ile indüklenen sessizleştirme kompleksi (RNA induced silencing complex-RISC)'ne bağlanır, 5- RISC ile bağlanmış olan pre-miRNA, Dicer 1 ile firkete halkasına yakın bölgeden kesilerek olgunlaştırılır**

## miRNA Matürasyonu

Memeli miRNA'larının olgunlaşması için mevcut modelde ilk adım, miRNA öncüsü veya pre-miRNA olarak bilinen 60-70 nt kök döngü ara maddesini serbest bırakan pri-miRNA'nın nükleer bölünmesidir<sup>261,262</sup>. Bu işlem, primer kök döngüsünün tabanına yakın bölgelerdeki sapın her iki kolunu da ayıran Drosha RNase III endonükleaz tarafından gerçekleştirilir<sup>261</sup>. Drosha, RNA dupleksini, RNaz III endonükleaz, aşamalı kesimi ile ayırır ve pre-miRNA kök halkasının tabanı, 5' fosfata ve 2-3 nt uzunluğunda çıkıntıya sahip olur<sup>261,263</sup>. Bu pre-miRNA, Ran-GTP ve eksport reseptörü Exportin-5 tarafından çekirdekten sitoplazmaya aktif olarak taşınır<sup>264,265</sup>.

Drosha'nın yaptığı nükleer kesme, olgun miRNA'nın bir ucunu tanımlar. Diğer uç, sitoplazmada Dicer enzimi tarafından işlenir<sup>261</sup>. Aynı zamanda bir RNase III endonükleaz olan Dicer, ilk önce RNA interferasına (RNAi) aracılık eden küçük interferas RNA'ların (siRNA'ların) üretilmesindeki rolüyle tanımlanmış olup miRNA olgunlaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir<sup>266-269</sup>. Mevcut miRNA olgunlaşma modeline göre, Dicer, RNAi sırasında çift sarmallı RNA'yı kesmesine benzer bir şekilde metagonal miRNA olgunlaşmasında rol oynar: ilk önce, pre-miRNA'nın çift sarmallı kısmını tanıır. Daha sonra, dubleksin her iki sarmalını kök halkasının tabanından yaklaşık iki sarmal uzaklıkta keser. Dicer tarafından yapılan bu bölünme, pre-miRNA'nın terminal baz çiftlerini ve halkalarını kapatır, 5' fosfat ucunu, 2-3 nt'lik bir çıkıntıyı bırakır. Bu çıkıntı ve 5'fosfat ucu RNase III'ün pre-miRNA'yı tanımasını sağlar ve RNase III, pre-miRNA'nın karşıt kolundan benzer büyüklükte bir fragmanı içeren siRNA benzeri kusurlu bir dubleks ve olgun miRNA'yı üretir.

Karşıt koldan gelen parçalar, miRNA\* sekansları<sup>229</sup> olarak adlandırılır fakat miRNA'lardan çok daha düşük bir frekansta bulunur<sup>242,247,251</sup>. Örneğin, 80 *C. elegans* miRNA'sını temsil eden 3400 klon tanımlanmıştır fakat 14 miRNA'yı \* temsil eden sadece 38 klon tanımlanabilmiştir<sup>251</sup>. Klonlama frekansındaki yaklaşık 100 katlık bu fark, miRNA: miRNA\* dupleks'inin, tek iplikli miRNA'ya kıyasla daha kısa ömürlü olduğunu göstermektedir.

Güncel modele göre, Drosha'nın aracılık ettiği ilk bölünmenin özgüllüğü, miRNA prekürsörünün doğru bölünmesini belirler ve böylece olgun miRNA'nın her iki ucunu tanımlar<sup>261</sup>. Drosha'nın özgül olup, Dicer'in özgül olmaması ilgi çekicidir çünkü araştırmalar, özgün çift sarmallı RNA'nın Drosha bölünmesine karşı dirençli olduğunu ve Dicer'in, sırasına

bakılmaksızın aşamalı olarak RNA çift sarmalını parçaladığını göstermiştir<sup>266,270-272</sup>. Drosha'nın bu özgül tanıma özelliğini sağlayanın ne olduğu henüz bilinmemektedir.

miRNA olgunlaşması için geliştirilmiş olan bu aşamalı teori, memeli Drosha ve Dicer fonksiyonunun araştırılmasına dayanmaktadır<sup>259,261</sup>. Bu modelin diğer metazoan türlerine uygulanabileceği, *C. elegans* lin-4 RNA'nın uzun formunun, lin-4 pre-miRNA'sından beklenildiği şekilde, tanımlanması ile desteklenmiştir<sup>225</sup>. Ayrıca, pek çok miRNA'nın kaynağı olduğu düşünülen pre-miRNA'ların Northern blotlarda tespit edilmesi ve Dicer aktivitesinin azaltıldığı durumlarda, pre-miRNA sayısının arttığının gösterilmesi, Dicer'in matürasyondan sorumlu olduğunu göstermiştir<sup>230,267-269</sup>. Son olarak, miRNA:miRNA\* duplex varlığı, nematodlarda ve sineklerde yapılan miRNA\* klonlamasında gösterilerek kanıtlanmış olmasına rağmen, miRNA genlerinin büyük bir çoğunluğunda miRNA\* tanımlanamamıştır.

### **RNA ile İndüklenen Susturma Kompleksi (RISC)**

Parçalanma ve nükleustan sitoplazmaya geçişten sonra, miRNA'nın bitkilerde ve hayvanlardaki yolakları biyokimyasal olarak ayırt edilemez gibi görünmektedir. Bitkilerde post-transkripsiyonel gen susturma (PTGS), mantarlarda ve hayvanlarda RNAi olarak bilinen RNA inhibisyon yolakları olduğu düşünülmektedir. RNAi'nin siRNA'sındaki benzerlik ve karışıklık miRNA biyojenezini ve fonksiyonunu anlamayı büyük ölçüde kolaylaştırılmıştır. Bu biyokimyasal bağlantıların ışığında, lin-4'ün keşfi ve lin-4'ün lin-14'ü düzenlenmesi, hayvanlarda RNAi benzeri bir fenomenin ilk karakterizasyonu olarak ele alınabilir.

RNAi yolağı, uzun çift-iplikli RNA ile başlar<sup>273</sup>. Çift sarmallı RNA, Dicer tarafından birçok 22 nt siRNA'ya işlenir<sup>267,269,270,274-277</sup>. Bu siRNA'lar 5' fosfatlı ve 2 veya 3 nt sarkan kısa çift iplikli ürünlerdir, RNase III parçalama ürünlerinin karakteristiklerinden taşınırlar. Sonunda tek iplikli RNAlar olarak, RNA kaynaklı susturucu olarak bilinen bir ribonükleoprotein ile indüklenen susturma kompleksine (RISC) dahil olurlar<sup>271,275,278-281</sup>. RISC, siRNA ve mRNA arasındaki mükemmel (ya da neredeyse mükemmel) tamamlayıcılığa dayalı hedef mesajlarını tanımlar ve RISC'in endonükleazı, mRNA'yı siRNA tamamlayıcılığının ortasına yakın bir alanda, siRNA'nın 5' ucundan ölçerek ve siRNA'nın kalıntıları 10 ve 11 ile eşleşen nükleotitler arasında keserek ayırır<sup>271,278</sup>. Bitkilerde ve mantarlarda gen susturma için benzer yollar önerilmiştir<sup>274,282,283</sup>.

RISC'in varlığı, sinek ve insan hücrelerinde gösterilmiş olup, her iki durumda da kompleksin çekirdek bir bileşeni olduğu düşünülen Argonaute protein ailesinin bir üyesini içerir<sup>280,284,285</sup>. Bu, Argonaute proteinlerinin (RDE-1, QDE2 ve AGO'ın sırasıyla Solucanlar, mantarlar ve bitkilerde) RNAi ve benzer işlemler için çok önemli olduğu ve önceki genetik verilerle uyumlu olduğu gösterilmiştir<sup>286-288</sup>. Argonaute ve homologları yaklaşık olarak bazen PPD proteinleri olarak adlandırılan 100 kDa proteindir, çünkü hepsi PAZ ve PIWI alanlarını paylaşırlar<sup>289</sup>. PAZ alanı (ilk olarak Piwi, Argonaute ve Zwiller / Pinhead proteinlerinde tanımlanmıştır), proteinin geri kalanından izole edildiğinde stabil katlantıya ve tek bir uzantıya sahiptir. Bu uzantı en az 5 nt uzunluğunda tek sarmallı bir RNA ve ayrıca çift sarmallı RNA'ya zayıf şekilde bağlanma özelliğine sahiptir<sup>290-292</sup>. Bu çift bağlanma yeteneği, Argonaute proteininin, mRNA hedefini tanımadan önce ve sonra siRNA ile doğrudan ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

RISC ile ilişkili diğer proteinler arasında, şüpheli RNA bağlayıcı proteinler VIG ve Fragile X ile ilişkili protein ve nükleaz Tudor-SN bulunur ve hiçbirinin RISC'deki rolleri tanımlanmamıştır<sup>293-295</sup>. Bu proteinlerin hiçbirisi saflaştırma şemalarında RISC ile saflaşmamıştır. Muhtemelen bu proteinler RISC'in ana komponentleri olup saflaştırma esnasında kaybolmaktadır. Alternatif olarak, çekirdek kompleksin özgüllüğünü veya işlevini değiştiren yardımcı faktörler olabilirler. RISC'nin farklı alt tiplerde geldiği düşüncesi, farklı türlerde bulunan Argonaute aile üyelerinin sayısı ile desteklenmektedir, *C. elegans*'ta sayısı 24'ü bulmaktadır ve farklı aile üyelerinin farklı susturucu RNA'lar ile genetik ve biyokimyasal etkileşim içerisinde olduğunu göstermektedir<sup>267,293,296</sup>. Slicer olarak bilinen RISC endonükleaz tanımlanmamıştır, bunun alt sitokiyometrik miktarlarda mevcut olabileceğini ve ancak RISC'nin diğer bileşenlerinin siRNA ile uygun bir eşleşme bulduktan sonra işlev gösterdiği düşünülmektedir. Başka bir olasılık, tanımlanan RISC bileşenlerinden birinin, tanınmayan bir nükleaz alanı vasıtasıyla Slicer aktivitesini sağlamasıdır.

MikroRNA'ların ilk olarak, insanlarda eIF2C2, Helikan gemin3 ve gemin4 proteinlerini içeren miRNA ribonükleoprotein kompleksinde (miRNP) bulunduğu bildirilmiştir<sup>245</sup>. eIF2C2, bir insan Argonaute homologudur ve daha sonra insan siRNA-programlı RISC'in bir bileşeni olduğu bulunmuştur<sup>280</sup>. Ayrıca, insan let-7 miRNA'sı eIF2C2 ile ilişkilidir ve yapay bir hedefin miRNA'ya mükemmel bir tamamlayıcılıkla bölünmesini belirleyebilir. Bu nedenle miRNP, RISC'yi tanımlayan belirgin özelliklere sahiptir<sup>285</sup>. Bu perspektif, bitki miRNA'larının doğal

hedeflerinin bölünmesini yönlendirebildiği<sup>297,298</sup> ve ilk olarak bölünmeyi belirtmek için tasarlanmış siRNA'ların da translasyon baskılanmasına aracılık edebildiği gösterilmiştir<sup>299,300</sup>.

miRNA:miRNA\* dupleksi RISC'e yüklendiğinde, miRNA \* soyulup ve bozunur. İki iplikten hangisinin RISC'ye gireceğini seçen mekanizma; dupleksin iki ucunun stabilitesinin göreceli oluşunda yatmaktadır: Hem siRNA hem miRNA dupleksleri için, RISC'ye giren iplik hemen hemen her zaman 5' ucu daha az sıkı bir şekilde eşleştirilmiş olmandır. Bu gözlem, bir helikaz benzeri enzimin (henüz tanımlanamayan), dupleksin uçlarını birçok kez örneklediğini gösterir - genellikle dupleksi verimli bir şekilde çözmeye başlamadan önce ucu serbest bırakır<sup>301,302</sup>. Hangi dupleks telinin RISC'ye gireceğini öngörmeye yönelik bu kural, ilk olarak hayvan sistemlerindeki gözlem ve deneylere dayanarak formüle edilmiştir, fakat aynı zamanda bitki siRNA'ları<sup>301</sup> ve bitki miRNA'ları için de geçerlidir. Bitki ve hayvan miRNA'larının büyük çoğunluğu için öngörülen, tüm miRNA'ların biyolojik oluşumunda geçici bir ara madde olarak miRNA: miRNA\* dupleksinin varlığını kuvvetle gösterir. Birkaç omurgalı ve böcek geni için, miRNA dupleksinin her iki ipliğinin de RISC'ye girdiği, her ikisinin de işlevsel olabileceği düşünülmektedir<sup>242,258,302</sup>. Bu nadir durumlar, RISC'nin asimetric yüklemesiyle bağdaştırılabilir, çünkü bu duplekslerin uçları neredeyse eşit stabiliteye sahiptir; her RISC için, helikaz her bir dupleksin sadece bir iplikçliğini yükler, ancak her bir ipliği benzer frekansta seçer<sup>302</sup>.

### **mRNA Bölünme Mekanizması**

MikroRNA'lar gen ekspresyonunu iki post-transkripsiyonel mekanizmadan biriyle RISC'i dow-regüle etmeye yönlendirebilir: mRNA bölünmesi veya translasyonel baskılama. Mevcut modele göre, post-transkripsiyonel mekanizmaların seçimi, küçük susturma RNA'sının bir siRNA veya miRNA olarak mı ortaya çıktığı ile değil, bunun yerine hedefin tanımlanması ile belirlenir. Sitoplazmik RISC'te miRNA'nın spesifik bir şekilde bölünmesi, mRNA'nın miRNA için yeterli tamamlayıcılığı varsa olur, mRNA bölünme için yeterli tamamlayıcılığa sahip değilse üretken translasyon baskılanır<sup>285,299,300,303</sup>. Her ne kadar bu model genellikle deneysel olarak desteklense de, oldukça işlevsel siRNA'lar ve metazoan miRNA'lar, her iki ilgili baskılama modu için doğal diferansiyel dizi tercihlerine işaret edebilecek olan, 12 ve 13 pozisyonlarında merkezlenen dizi-bileşim farklılıklarına sahiptir<sup>301</sup>.

Bir miRNA parçalanmaya kılavuzluk ettiğinde, kesim tam olarak siRNA-kılavuzlu ayrılma için görülenle aynı bölgededir<sup>271,285,297,304</sup>. Bölünme, miRNA hedefin 5' ucuyla

mükemmel eşleşme olmasa bile değişmez<sup>238,304</sup>. Bu nedenle, kesim yeri miRNA:hedef baz çiftleri eşleşmesi ile değil miRNA kalıntılara göre belirlenir. mRNA'nın bölünmesinden sonra, miRNA bozulmadan kalır ve ek mesajların tanınmasına ve imha edilmesine rehberlik eder<sup>285,298</sup>.

### **mRNA Translasyonel Baskılama Mekanizması**

En başından beri, lin-4 RNA'nın *C. elegans* lin-14 mRNA'nın translasyonel baskılamasını belirlediği öne sürülmüştür. Bu, lin-4 RNA ekspresyonunun, lin-14 mRNA'sında bir değişiklik olmadan LIN-14 proteinindeki düştüğü gözleminin en basit yorumudur<sup>226</sup>. Sürpriz, ilk larval evrede lin-14 mRNA'nın polisomik profilinin, LIN-14 protein seviyelerinin düştüğü sonraki larva evrelerindekiinden ayırt edilemez olduğu tespit edildiğinde ortaya çıkmıştır<sup>305</sup>. Aynıısı, lin-4 RNA tarafından hedeflenen başka bir mesaj olan lin-28 mRNA için de geçerlidir<sup>306</sup>. Bu sonuçları açıklamak için iki olasılık öne sürülmüştür<sup>305</sup>. Lin-4 RNA, translasyon başlangıcından sonraki bir adımda, örneğin ribozomların yoğunluğunu, tüm ribozomların yavaşlatılması veya durdurulmasıyla algılanabilir bir şekilde değiştirmeyen bir şekilde translasyonu baskılayabilir. Alternatif bir olasılık, translasyonun aynı hızda devam etmesi ancak verimsiz olmasıdır, çünkü yeni sentezlenmiş polipeptit, özellikle bozulur.

Herhangi bir metazoan miRNA hedefinin lin-4'ün dışındaki hedeflerinin translasyonel baskısı için kanıtlar yetersizdir, çünkü miRNA aracılı düzenleme sırasında haberci RNA'nın kaderi henüz bu lin-4 olmayan hedefler için izlenmemiştir. Bununla birlikte, birkaç dolaylı kanıt, lin-4 RNA dışındaki metazoan miRNA'ların tipik olarak mRNA bölünmesi yerine translasyonel baskılamaya aracılık ettiği fikrini desteklemektedir: Birincisi, siRNA'ların yanı sıra, diğer metazoan miRNA'lar, mRNA'yı düşürmeden, heterolog raportör transkriptlerini baskılayabilir Bu mesajlar, miRNA hedefindeki doğal miRNA tamamlayıcı alanlarını veya miRNA ile eşleştirildiğinde merkezlerinde çıkıntı veya uyumsuzluk bulunan çoklu yapay tamamlayıcı bölgeleri içermesi durumunda RNA ve *C. elegans*'taki doğal tamamlayıcı bölgeleri, lin-41 3' UTR<sup>299,300,303</sup>. İkincisi, insan hücrelerine endojen olan let-7 programlı RISC, *C. elegans* lin-41'de bulunan let-7 tamamlayıcı bölgelerini içeren bir RNA parçasını parçalamaz<sup>285</sup>. Üçüncüsü, miRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki tamamlayıcılığın derecesi bakımından bitkiler ve hayvanlar arasında bir fark vardır<sup>307</sup>. RISC aracılı bölünme için mükemmel yakın tamamlayıcılığın gerekli olduğu düşünülmekte, ancak translasyonel baskı için gerekli olmadığından, hayvanlarda görülen düşük dereceli tamamlayıcılık, translasyonel

baskının hayvanlarda bitkilerden daha yaygın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, daha fazla metazoan miRNA düzenleyici hedefinin, bölünmeden daha geçici olarak inhibe edildiği sonucuna varmak erken olabilir. Şaşırtıcı bir şekilde, memeli hücrelerinde saptanabilir RISC aracılı bölünme belirtmek için çok az bir tamamlayıcılığa ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır, bu, hayvanlarda miRNA-yönlendirmeli mRNA bölünmesinin doğal örnekleri rapor edilmesinden çok uzun sürmeyeceğini göstermektedir<sup>308</sup>.

Birden fazla RISC'in işbirliğinin, en verimli translasyon inhibisyonunu sağladığı görülmektedir<sup>299</sup>. Bu, metazoan miRNA'ların belirlenmiş hedeflerinde çoklu miRNA tamamlayıcı alanların varlığını açıklar<sup>225,226,239,309,310</sup>. Bilgisayar temelli hesaplamalar ile tanımlanmış metazoan hedefleri ayrıca birden fazla alana sahiptir, ancak bu kalıp, verimsizdir, çünkü çok sayıda sitenin varlığı, tanımlamaları için bir kriterdir<sup>231,311,312</sup>. Her hangi bir hayvanda miRNA-mRNA düzenleyici çiftlerin sadece küçük bir kısmı bilinmesine rağmen, aynı hedefleri düzenlemek için farklı miRNA'lar olduğu öne sürülmektedir<sup>239,309,310</sup>.

Bilinen metazoan hedeflerinin tamamlayıcı alanları 3 UTR'lerde bulunur. Bu önyargı belki de bağlı komplekslerin ribozomun mRNA temizleme aktivitesinden kaçınmasını sağlayan mekanik bir tercihi yansıtabilir. Çok sayıda ökaryotik çeviri düzenlemesi örneğine 3 UTR elementleri aracılık eder<sup>313</sup>. Alternatif olarak, metazoan miRNA'nın hedefleri ve tamamlayıcı siteler keşfedilme biçimindeki bir önyargıyı yansıtabilir. Lin-4: lin-14 örneği, araştırmaları 3UTR'lere yönlendirmiştir ve korunan tamamlayıcı bölgelerin UTR'lerde tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. Bir memeli raportör yapısının ORF'sinde tek bir kusurlu tamamlayıcı alandan bildirilen siRNA aracılı translasyonel baskı, çoğu metazoan miRNA düzenlemesinin 3 UTR'lerde çoklu tamamlayıcı bölgeler aracılığıyla aracılık ettiği sonucuna varılmasının nedenini göstermektedir<sup>314</sup>.

İncelenen düzinelerce miRNA-hedef ilişkisi arasında, gen ifadesinin regülasyonunu yönlendiren miRNA'lar için kanıt bulunamamıştır. Bu bulgular, miRNA'ların hepsinin bir susturma kompleksi, yani RISC içerisinde hareket ettiği fikri ile tutarlıdır. MiRNA'lar RISC kompleksleri içinde işlev görmeye sınırlı olsa da, bazı miRNA'ların sadece post-transkripsiyonel baskıdan daha fazlasını belirtme olasılığı vardır; bazıları transkripsiyonel susturma için DNA'yı hedefleyebilir. Argonaute proteinleri ve siRNA'lar bitkilerde DNA metilasyonu ve susturması<sup>296,315,316</sup>, mantarlarda heterokromatin oluşumu<sup>317-319</sup> ve siliatlarda DNA'nın yeniden düzenlenmesi ile ilişkilidir<sup>320</sup>. Bu örneklerin her biri, bir nükleer RISC benzeri kompleksin varlığını göstermektedir.

## Hedef Tanıma Mekanizması

lin-14 UTR'lerin 'çekirdek elemanları'nın lin-4 miRNA'larının 5' ucu ile olan tamamlayıcılık özelliği gözlemlenmesi, miRNA'ların 5' ucunun tanımlayıcılıktaki önemini göstermiştir<sup>226</sup>. Bu fikri destekleyen güncel gözlemler şunlardır;

1. Birkaç omurgasız miRNA'nın 2-8 kalıntıları, daha önce posttranskripsiyonel baskıya aracılık ettiği gösterilen 3' UTR elemanları arasında mükemmel tamamlayıcılık gözlemlenmiştir<sup>321</sup>.
2. Omurgasız miRNA'ların ilk kanıtlanmış hedeflerinin miRNA tamamlayıcı bölgelerinde, miRNA'nın 2-8 kalıntıları ile eşleşen (bazen kusurlu) mRNA kalıntıları, diğer türlerin orijinal mesajlarında mükemmel bir şekilde korunduğu gözlemlenmiştir<sup>312</sup>.
3. miRNA'nın 2-8 kalıntıları, homolog metazoan miRNA'lar arasında en fazla korunduğu gözlemlenmiştir<sup>251,311</sup>.
4. Memeli miRNA'larının hedeflerini tahmin ederken, miRNA'nın 2-8 arasındaki heptamer yayılma tortularına mükemmel eşleşmenin gerekli olduğu, miRNA'nın diğer herhangi bir heptamerinin eşleştirilmesinin gerekenden çok daha verimli olduğu gözlenmiştir<sup>311</sup>.

Bu 5' çekirdek bölgeye eşleştirme aynı zamanda orantısız olarak siRNA-aracılı mRNA bölünmesinin özgünlüğünü de yönetmektedir<sup>308,322</sup> ve aynısı mRNA bölünmesine aracılık eden bir bitki miRNA'sı için de geçerlidir<sup>239</sup>.

Gen düzenleme mekanizması ne olursa olsun, akla küçük RNA'nın 5' sonuna kadar tamamlayıcılık evrensel olarak neden önemli olduğu sorusu gelmektedir. Olasılıklardan birisi, RISC'nin mRNA'larla eşleşmeyi sadece bu çekirdek bölgede sunmasıdır. Bir A-form sarmalının geometrisinde önceden düzenlenmiş olan bu 7 nükleotidlerin sunulması, eşleşen mRNA segmentleri ile olan afinitiyi artırır. Bu uzunluğun önceden oluşturulmuş bir helikal bölümünün sunumu, daha önceden önceden düzenlenmiş helikal geometri ile bağlantılı topolojik zorluklar ve daha kısa bir çekirdekten kaynaklanacak olan başlangıç bağlanma spesifikliğindeki düşüş arasında makul bir uzlaşma olacaktır. Bu senaryoda, çekirdek bölgeyle uyumsuzluklar başlangıçtaki hedef tanımayı engeller ve böylece tamamlayıcı bölgede başka bir



yerde tamamlayıcılık derecesine bakılmaksızın bölünme veya çeviri baskılamasını önler. miRNA'nın geri kalanının katılmasına izin verildikten sonra yeterli ek eşleşme varsa, bölünme meydana gelir. Bununla birlikte, sadece birkaç yan çift tarafından desteklenen çekirdek eşleşmesi, mesaja bağlı diğer RISC'lerle işbirliği içinde çeviri baskısına aracılık etmek için yeterli görünmektedir<sup>311</sup>. İlginç bir şekilde, Argonaute PAZ bölgesinin daha önce belirtilen hem çift hem de tek iplikli RNA'ları bağlama kabiliyeti, çekirdeğe sunmak ve çekirdek eşleştirmesini stabilize etmek için uygun bir aday olacaktır<sup>290-292</sup>.

## **miRNA'ların Regülatuvar Roller**

Yüzlerce farklı miRNA'nın keşfedilmesinden ortaya çıkan en önemli soru, bu küçük kodlamayan RNA'ların işlevinin ne olduğudur. Lin-4, let-7 ve tanımlanan diğer birçok miRNA için, kodlayıcı olmayan RNA genleri olarak statülerinden bile önce fonksiyonlarına ve düzenleyici hedeflere önemli ipuçları keşfedilmiştir<sup>231-233,235,323-327</sup>. Bunlardan bazıları miRNA düzenlemesini bozabilecek bazı fonksiyonların işlevi, mutasyona uğramış bir miRNA'nın veya değiştirilmiş bir miRNA tamamlayıcı bölgesinin fenotipik sonuçları ile belirlenmiştir. Diğer durumlarda, işlev miRNA'nın ektojik ekspresyonuna yol açan mutasyonların veya transgenik yapıların etkilerinden çıkarılmıştır.

miRNA'ların büyük çoğunluğu için, bozulmuş veya değiştirilmiş miRNA düzenlemesinin fenotipik sonuçları bilinmemektedir. Bununla birlikte, miRNA'ların düzenleyici hedeflerini bulmak için hesaplamalı yaklaşımlar geliştirilmekte ve bu hedeflerin bilinen rollerine dayanarak miRNA işlevine ilişkin ipuçları sağlanmaktadır<sup>307,311,312,328</sup>. Bu hedeflerin kimliğini destekleyen deneyler tipik olarak iki sınıfa ayrılır. miRNA'nın mRNA bölünmesini belirlediği düşünülen durumlarda, bölünme ürünleri ters kopyalanabilir, klonlanabilir ve dizilebilir; Kesin olarak tahmin edilen bölünme bölgesinde biten sekansların bir bileşimi, bu mRNA'nın tamamlayıcı miRNA'nın bir bölünme hedefi olduğuna dair deneysel bir doğrulama sağlar<sup>297,304,329</sup>.

Hem translasyonel bakılamanın hem de mRNA bölünmesinin tespit edilmesini sağlamak için, miRNA tamamlayıcı bölgelerinin bir raportör genine birleştirildiği ve ekspresyonun kontrol yapılarına göre veya miRNA'nın varlığında ve yokluğunda incelendiği heterolog raportör analizleri kullanılabilir<sup>311,312</sup>. miRNA tamamlayıcı alan(lar)ının multimerizasyonunu içeren deneyleri yorumlarken dikkatli olunması gerekir, çünkü böyle bir deney, amaçlanan hedefle ilgili olmayan ancak benzer şekilde açıklanmış bir genden yanlış bir

şekilde alınmış bir miRNA tamamlayıcı alanını doğrulamayı başarmıştır<sup>330</sup>. Heterolog deneylerde pozitif bir sonuç, miRNA düzenlemesi için ihtiyaç duyulan belirleyicilerin gerçekte, hem miRNA'nın hem de tamamlayıcı alanlarının evrimsel korunumu ile birlikte düzenleyici bir ilişkinin makul bir kanıtını sağlayabilecek olan raportöre kaynaşmış mRNA parçası içinde bulunduğunu göstermektedir. Elbette, bu tür bir hipotez, miRNA'nın ve hayvan veya bitkideki hedefinin çakışan ifadesinin veya miRNA'nın veya tamamlayıcı bölgesinin doğal in vivo bağlamında manipüle edilmesinin etkilerini inceleyen deneylerle kanıtlanır.

### 2.3.1. miRNA'LARIN KARSİNOGENEZDEKİ ROLÜ

Literatürdeki son bulgular bazı miRNA'ların ekspresyonundaki değişimlerin bazı kanser tipleri ile ilişkili olabileceği tespit edilmiştir. Let-7, miR-15a/miR-16-1 kümesi ve bunun komşuluğunda bulunan miR-143/miR145'in ekspresyonunun pek çok kanser türünde azaldığı, bu miRNA'ların potansiyel tümör supresör olarak görev görebileceği öne sürülmüştür<sup>244,256,331,332</sup>. Bunun tam tersi miR-17-92 kümesi ve miR-155/BIC kümesi için geçerlidir. Bu miRNA'ların aşırı ekspresyonunun onkojenik potansiyel taşıdığı tespit edilmiştir<sup>333-336</sup>. Tüm bunlara ek olarak bazı miRNA'ların genlerinde olabilecek delesyon, amplifikasyon ve mutasyon gibi durumlar, ekspresyon düzeylerini etkileyebilir.

İnsan karsinogenezinde yer alabileceği düşünülen miRNA'lardan ilki, let-7'dir. let-7'nin azalmış ekspresyonunun akciğer kanser hücrelerinde gösterilmesi, bu hücrelerin büyümesinde etkili olduklarını düşündürmektedir. let-7'nin ekspresyonunun azalmasının akciğer kanserindeki prognostik değeri gösterilmiştir<sup>337</sup>. İnsanlardaki RAS geninde, let-7'ye ait pek çok hedef bölge bulunduğu tespit edilmiş olup bu bölgelerdeki değişimlerin insan akciğer kanser gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir<sup>338</sup>. let-7'nin hedeflerinden biri olan ve omurgalılardaki homoloğu lin-41'in embriyogenez ve ekstremitte gelişiminde de etkili olduğu tespit edilmiştir<sup>339,340</sup>. lin-41 geni tümörögenizde de etkilidir, insanda bu gen 3p23 bölgesinde bulunur ve akciğer kanserinde sıklıkla delesyona uğradığı tespit edilmiştir<sup>340</sup>.

Yapılan çalışmalar miRNA genlerinin sıklıkla kanser ilişkili genomik bölgelerin yakınındaki kırılma bölgelerinde yerleştiği görülmektedir. miR-15a ve miR-16-1 miRNA kümesi kromozom 13q14 bölgesinde yer almaktadır ve kanser gelişiminde ekspresyonunda değişiklik görülen miRNA'lara ilk örnektir. Bu bölgenin delesyonu veya down regülasyonu pek çok kronik lenfositik lösemide tespit edilmiş olup bu miRNA'ların lösemi gelişiminde etkili olduğu öne sürülmüştür<sup>341</sup>. Bu delesyonun tespit edildiği KLL vakalarında prognozun daha iyi

olduğu<sup>342</sup>, aşırı ekspresyonunun ise kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>343</sup>. Bu miRNA'ların delesyonu, pitüiter adenomlarda da görülmektedir<sup>332</sup>. Bu kümenin paraloğu olan miR-15b ve miR-16-2 3q25 kromozomal bölgesinde lokalize olup pek çok kanser tipinde amplifiye olmaktadır<sup>344</sup>. Bu bölgenin heterozigot delesyonu ise akciğer kanseri gelişiminde etikidir<sup>345</sup>.

miRNA'lar araştırılmaya devam edildikçe daha çok miRNA'nın pek çok kanser türünün gelişiminde rolü olabileceği gösterilmiştir. miR-143 ve miR-145 kolorektal epitelden kanser gelişimi ve adenomatöz polip gelişimi ile ilgili olduğu, miR-143'ün adiposit diferansiyasyonunda etkili olduğu ve muhtemelen hedef geni olan ve tirozin kinaz sinyal yolağı ERK5 (MAPK7) vasıtasıyla hücre büyümesi ve proliferasyonuna etkili olduğu düşünülmektedir<sup>331,346</sup>.

miRNA-155, insanlarda primer akciğer fibroblastlarında, anjiotensin II tip 1 reseptörü (AGTR1) eksprese eden mRNA'ya bağlandığı ve bu proteinin ekspresyonunu azalttığı tespit edilmiştir. TGF-β1 tedavisinin miRNA-155 ekspresyonunu azaltarak AGTR1 ekspresyonunu arttırdığı ve büyümeyi durdurduğu gösterilmiştir<sup>347</sup>.

miRNA'lar hematopoetik progenitor hücrelerin diferansiyasyonunda etkilidir. MiR-221 ve miR-222, CD 34+ hematopoetik hücrelerde down regüle olur, bu down regülasyon sonucu kit proteini ekspresyonu artar ve bu protein hematopoetik hücre diferansiyasyon düzenlemesinde ana rol oynayan proteindir. Her iki miRNA kit mRNA 3' UTR ucuna bağlanır ve ekspresyonunu baskılar. Bu miRNA'lar inhibe edilmesi halinde kit ekspresyonunun arttığı ve eritoblastik lösemi hücrelerinin proliferasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir<sup>348</sup>. Bu mikroRNA'ların miR-146 ile birlikte papiller tiroid karsinom hücrelerinde de up regüle oldukları gösterilmiştir. Bu üç miRNA'ın up regülasyonu yine Kit mRNA'sı ile etkileşerek ekspresyonunu baskılar ve papiller tiroid karsinomu gelişme riskini arttırır<sup>349</sup>.

Karsinogenezde etkili olan bir başka miRNA da miR-21'dir. miR-21'in aşırı ekspresyonu malign beyin tümörü olan glioblastomada gösterilmiş olup, miR-21 knock down edildiği hücre kültürlerinde kaspaz aktivasyonunun arttığı ve bunun da hücre apoptozunu arttırdığı görülmüştür. Bu bulgular miR-21'in apoptoz ilişkili genleri baskılayarak tümörogenezde rol oynayabileceği düşünülmektedir<sup>350</sup>.

miRNA'ların kendisinin yanında miRNA işlem basamakları da kanser gelişiminde etkili olabilir. Haris ve ekibi Dicer'in akciğer epitel morfogenezinde önemli olduğu ve FGF10 ekspresyonunun düzenlenmesini sağladığını tespit etmiştir. Ayrıca Dicer ekspresyonunda azalmanın akciğer kanseri hastalarında hayatta kalımı azalttığı ve prognozu olumsuz olarak etkilediği bulunmuştur<sup>351</sup>.

Akciğer, meme, mide, prostat, kolon ve pankreas kanserlerinde çeşitli miRNA tipleri tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların düzeyleri kanser tanı ve prognozunda önemli olabileceği düşünülmektedir. miR-21'in bu kanser tiplerinin her birinde yüksek düzeyde eksprese olduğu gösterilmiş olup, miR-17-5p ve miR-191'in meme ve mide kanseri hariç diğer kanserlerde aşırı eksprese edildiği görülmüştür. Bu tespitler miRNA'ların kanser prognozunda etkili olabileceğini düşündürmektedir<sup>352</sup>.

Kronik Lenfositik Lösemi'de tespit edilen 13 miRNA'nın hasta prognozunu belirleyebileceği görülmüştür. Yüksek ZAP-70/mutasyona uğramamış IgVH fenotipinin düşük olan fenotipe göre daha iyi prognozlu olduğu gösterilmiştir fakat bu mutasyonda miRNA'nın yeri tam belirtilmemiştir<sup>343,353</sup>. Iorio ve ekibi bir dizi miRNA'nın aberran ekspresyonunun meme kanserinde göstermiştir. MiR-21 ve miR-155'in meme kanserli dokularda aşırı eksprese oldukları, miR-125b ve miR-145'in down regüle olduğu gösterilmiş olup bu miRNA'ların normal ve kanserli dokunun ayırımı yapılırken kullanılabileceği belirtilmiştir<sup>354</sup>.

miRNA'lar ile ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler arttıkça miRNA'ların karsinogenezdeki potansiyel önemi de ön plana çıkmaktadır. Bu yeni biyobelirteçlerin potansiyel bir tedavi hedefi olabileceği de düşünülmektedir. Fakat bu konu henüz çalışma aşamasındadır.

### **2.3.2. miRNA-21'İN KANSERDEKİ ROLÜ**

Memeli hücrelerinde, miR-21 sayısız kanser türüyle ilişkili olarak bol miktarda eksprese edilen bir miRNA'dır<sup>355,356</sup>. Koşullu bir miR-21 knock-in faresinin üretilmesiyle, miR-21'in aşırı ekspresyonu ile bir onkogen olarak işlev gösterdiği ve bunun malign B hücreli lenfoma ile sonuçlandığı gösterilmiştir<sup>357</sup>. Nitekim, kanser hastalarından 540 klinik numuneyi profillendiren bir çalışmada sürekli artan tek miRNA'nın, miRNA-21 olduğu tespit edilmiştir<sup>352</sup>. miR-21 ayrıca B/T lenfositler, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere hematopoetik hücrelerinde de ifade edilir. Bu nedenle, yüksek miR-21

seviyelerinin immün hücre aktivasyonunun bir belirteci olduğu düşünülmektedir<sup>358</sup>. Patolojik nekroz ile ilgili olarak, miR-21, ölüm reseptörü aracılı intrinsik apoptotik yolla ilişkili tümör baskılayıcı genleri negatif düzenleyerek hücrel nekrozu artırır<sup>359</sup>.

miR-21 geni insanlarda 17q23.2 kromozomda bulunur. MiR-21 geninin birincil transkripti, üst üste binen protein kodlayan genin<sup>360</sup> intronu içinde yer alan korunmuş bir promotörden bağımsız olarak kopyalanır. Deneysel veriler, çok sayıda hücre tipinde, miR-21'in bir anti-apoptotik ve sağkalım faktörü olarak işlev gördüğünü göstermiştir<sup>350,361</sup>. MiR-21'in yüksek ekspresyon seviyeleri, kanser hücrelerinin bir özelliği olabilir ve patolojik hücre büyümesi veya hücre stresinin ortak bir özelliğini temsil eder. Örneğin, miR-21'in bir fare kalp hipertrofisi modelinde ve vasküler neointimal lezyon oluşumunda up regüle olduğu gösterilmiştir<sup>362,363</sup>. MiR-21'in indüksiyonu hücrel farklılaşma ile ilişkilidir. Dikkate değer bir örnek, tiroid stimulan hormonun varlığına bağlı olan kısıtlı tiroid hücre dizisi FRTL-5'tir<sup>364</sup>. Bu bulgular, nispeten düşük seviyelerde miR-21'in farklılaşma ve gelişme için gerekli olabileceği hipotezine yol açarken, yüksek seviyelerde onkogenik etkiler olabileceği hipotezi ortaya çıkmıştır. Bağışıklık sistemi ile ilgili olarak, miR-21'in T hücresi bağışıklığını düzenlediği gösterilmiştir<sup>365</sup>. Pro-enflamatuar T helper (Th) 1 ve anti-enflamatuar Th2 hücreleri, birbirlerinin farklılaşmalarını ve fonksiyonlarını ters düzenleyerek dengeli bir durumda bulunur. miR-21, aktive edilmiş dendritik hücrelerde indüklenir ve doğrudan Th1'i teşvik eden interleokün (IL)-12'nin p35 alt ünitesini kodlayan mRNA'yı ve miR-21 eksikliği bulunan farelerde dendritik hücrelerin IL-12 salgılanmasını arttırmasının yanı sıra, gelişmiş Th1 gelişimi gözlenmiştir<sup>366</sup>. Dendritik hücreden türetilmiş miR-21'e ek olarak, T-hücre intrinsik miR-21'in, bir mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) yolu inhibitörü (MAPK) yol inhibitörü olan Sprouty homolog 1 (Spry 1) transkripsiyonunu inhibe ederek Th2 farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir<sup>367</sup>. Ayrıca, miR-21'in, lupus hastalarından ve ayrıca lupus eğilimli MRL / lpr farelerinden türetilen CD4 + T hücrelerinde, otoimmün hastalık ile kuvvetli bir ilişki olduğunu gösterdiği bulunmuştur.

miR-21'in solid ve hematolojik malignitelerde en yaygın up regüle olan miRNA olduğu gösterilmiştir<sup>352</sup>. Kapsamlı çalışmalar tümör patogenezindeki ve diğer tüm karsinogenez aşamalarındaki rolünü ortaya koymuştur.

Bugüne kadar, miR-21'in onkogenik aktivite gösterdiğini kuvvetli bir şekilde öneren şu fonksiyonel çalışmalar yapılmıştır:

i) Glioblastoma hücre kültüründe miR-21'in ortadan kaldırılması, kaspaz aktivasyonu sağlayarak, apoptotik hücre çlümünün artmasını sağlamıştır. Bu gözlem miR-21'in anti-apoptotik bir faktör olduğunu düşündürmektedir<sup>350</sup>;

ii) İnsan miR-21 geni, insan papilloma virüsü (HPV) entegrasyon lokuslarından biri olan 17q23.2 kromozomal bölgesi içindeki frajil bölge olan FRA17B'de bulunur. HPV'nin konak hücre genomuna entegrasyonu, genetik ve epigenetik değişikliklere neden olur; bu, HPV entegrasyon alanı veya yakınında miR-21 geninin, serviks kanserindeki artışına katkıda bulunabileceğini ileri sürülmüştür<sup>368</sup>;

iii) miR-21'in hepatoma hücrelerinde inhibe edilmesi, miR-21'in doğrudan bir hedefi olan kromozom 10 (PTEN) üzerinde silinen tümör baskılayıcı fosfataz ve tensin homologunun ekspresyon seviyesini arttırmış ve tümör hücresi çoğalmasını, göçünü ve migrasyonunu azaltmıştır<sup>369</sup>. Ayrıca, kolorektal kanserde miR-21 ekspresyonunun, kanser ilerlemesine yol açan Spry2 ve PTEN ile ters korelasyon gösterdiği bulunmuştur<sup>355</sup>;

iv) miR-21'in, HMG-box transkripsiyon faktörü 1-p53-sterol düzenleyici element-bağlama transkripsiyon faktörü 1 yolu ile etkileşime girerek hepatik lipid birikimini ve kanser ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir.

Kanıtlar miR-21'in bir onkojenik miRNA olduğunu desteklemektedir. MiR-21'in aşırı ekspresyonu, hematolojik ve solid maligniteler ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. miR-21, çeşitli kanser türleri için potansiyel ve tedavi edici bir hedef olarak tanısal ve prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabilir<sup>370</sup>. miR-21'in baskılanmasının, tümör supresörünün tropomiyosin I'in aşağı-düzenlenmesi yoluyla tümör büyümesini inhibe ettiği keşfi ile bir onkogen gibi davrandığı düşüncesi kuvvetlenmiştir<sup>371</sup>.

Önceki çalışmalar, yeni tümör baskılayıcısının programlanmış hücre ölümünü koruyan protein 4'ün (PDCD4) insanlardaki bazı solid tümörlerde down regüle edildiğini ve miR-21 tarafından baskılandığını ortaya koymuştur<sup>372</sup>. Fosfataz ve tensin homologlarının (PTEN), kolanjiokarsinom hücrelerinde doğrudan miR-21 hedefi olduğu gösterilmiştir<sup>373</sup>. Dolayısıyla, miR-21'in rolü apoptozun inhibisyonu olması muhtemeldir. Bazı büyüme faktörleri, miR-21 ekspresyonunu düzenler; yakın tarihli bir raporda, transforming büyüme faktörü-B'nin (TGF-b) dönüştürülmesinin, pri-miR-21'den pre-miR-21'e geçişi teşvik ederek, SMR sinyal transdüksiyon yoluyla miR-21 ekspresyonunu arttırdığı ortaya çıkmıştır<sup>374</sup>.

### 2.3.3. miRNA-101'İN KANSERDEKİ ROLÜ

Birçok miRNA, birçok tümörde down regüle olur ve tümör baskılayıcı genler olarak işlev görür<sup>375</sup>. Bu down regüle edilmiş miRNA'lar arasında miR-101, insan kanserlerinde en fazla down regüle edilen miRNA'lardan biridir<sup>376,377</sup>.

miR-101, iki prekürsör gen lokusundan transkribe olur: 1p31 kromozomundan miR-101-1 ve 9p24 kromozomundan miR-101-2. Son zamanlarda çeşitli neoplazmların insidansında ve gelişiminde tümör baskılayıcı olduğu kabul edilmiştir<sup>245</sup>. Mevcut araştırmalara dayanarak, miR-101, mide kanseri (GC)<sup>378</sup>, intra-hepatik kolanjiyokarsinom (CC)<sup>379</sup>, osteosarkom (OS)<sup>380</sup>, hepatoselüler karsinom (HCC)<sup>381</sup>, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)<sup>382</sup>, oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC)<sup>383</sup>, mesanenin transiyent hücreli karsinoması (BTCC)<sup>384</sup>, rahim ağzı kanseri<sup>385</sup>, pankreas intraductal papiller musin neoplazmı (IPMN)<sup>386</sup>, ERa-pozitif meme kanserinde<sup>387</sup> down regüle olmuştur. Ayrıntılı olarak, miR-101'in proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, ilaç direnci, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere birçok kanserle ilgili biyolojik süreçte yer aldığı bildirilmiştir<sup>388-390</sup>. MiR-101, atmosferik parçacıklar, virüsler, proinflamatuvar sitokinler ve benzeri gibi birçok dışsal ve içsel faktörden etkilenmektedir. Bu arada, miR-101'in hedefleri karmaşıktır, bu da miR-101'in farklı hedef genleri modüle edebildiği anlamına gelirken, tek bir hedef gen miR-101 de dahil olmak üzere çoklu mikroRNA'lar tarafından düzenlenebilir. Bu nedenle, farklı moleküler mekanizmanın gelecekte daha fazla keşif yapmayı hak ettiği görülebilir. Kanserdeki rolünün yanı sıra, miR-101'in çoklu sistem atrofisi (MSA)<sup>391</sup>, hepatopulmoner sendrom (HPS)<sup>392</sup>, kardiyak fibroblastlar (KF'ler)<sup>393</sup>, HBV ile ilişkili kronik hepatit<sup>376</sup>, Alzheimer<sup>394</sup>, pulmoner fibrozis<sup>395</sup>, akut böbrek hasarı<sup>396</sup>, gestasyonel diabetes mellitus (GDM)<sup>397</sup> gibi malign olmayan hastalık çeşitleriyle ilişkili olduğu iddia edilmektedir. MiR-101'in, çeşitli hastalıkların, özellikle malign neoplazmaların başlatılmasında ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar artmaktadır.

Hücre proliferasyonu, hücresel işlemlerde çok önemlidir ve miR-101'in, birkaç hedef genin düzenlenmesiyle tümör proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir. MiR-101'in, zeste 2 polycomb represif kompleks 2 subunit arttırıcı gen (EZH2) ekspresyonunu azaltarak akciğer kanserinde<sup>390</sup> ve embriyonel rabdomiyosarkomda (eRMS)<sup>398</sup> doğrudan hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Polycomb grubu (PcG) protein ailesinin bir üyesi olan EZH2, gen susturmasını sağlamada önemli bir rol oynayan histon H3 lizin 27 (H3-K27) trimetilasyonu katalizleyerek histon metil transferaz olarak işlev görmekte ve çeşitli neoplazmların proliferasyonuna katkıda bulunmaktadır<sup>399</sup>. Ayrıca, Wilms tümörünün mezenkimal kök

hücresinde, miR-101, miR-26a ve Wilms tümör baskılayıcı gen1 (WT1) ile birlikte çalışarak, EZH2'yi hedef alarak hücre proliferasyonunu belirgin şekilde bastırmıştır<sup>400</sup>.

Bunlara ek olarak, SiO<sub>2</sub> partikülünün indüklediği akciğer kanserinde SiO<sub>2</sub> partikülü, miR-101'i negatif olarak modüle eden IL-1b'nin birikimini uyarmıştır. Sonra IL-1b tarafından baskılanan miR-101, EZH2 ekspresyonunu inhibe etmiş ve böylece hücre proliferasyonunu sınırlanmıştır<sup>401</sup>. İlginç bir şekilde, miR-101'in, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde (KHDAK) Lin28B'nin ekspresyonunu azalttığı ve böylece IL-1b tarafından COX2-HIF1a yolu ile sınırlandırılabilir hücre proliferasyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir<sup>402</sup>.

miR-101 doğrudan SOX9'u hedefleyerek hepatoselüler kanserde (HCC) hücre çoğalmasını önlediği gösterilmiştir<sup>403</sup>. Dahası, miR-101'in, HCC'de HBV tarafından azaldığı ve ras ile ilişkili protein 1'in izoformlarından biri olan, ras ile ilişkili protein-1b'yi (Rap1b) hedef alarak hücre çoğalmasını azaltmada büyük bir potansiyele sahip olduğu keşfedilmiştir<sup>404</sup>. G proteinlerinin Ras üst ailesinin bir üyesi olan Rap1, hücresel zarlarda bulunan ve hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu bildirilen küçük bir GTPaz'dır<sup>405</sup>.

Meme kanserinde DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A) seviyesini seyreltmek için miR-101'in hücre proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür<sup>406</sup>. Bu arada, DNMT3A'nın NSCLC'de biriktiği ve miR-101 tarafından baskılanabilen PTEN / AKT yolunu aktive ederek tümör hücresi proliferasyonunu hızlandırdığı da keşfedilmiştir<sup>407</sup>. Ek olarak, meme kanserinde miR-101, proteazom olgunlaşma proteinini (POMP) ve Stathmin 1'i (Stmn1) hedef alarak hücre çoğalmasında baskılayıcı olarak çalışmaktadır<sup>387,408</sup>. Özellikle, miR-101 ekspresyonunun arttırılması, Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1'in (Rac1) seviyesini seyreltebileceği, böylece papiller tiroid karsinomunun (PTC) hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği düşünülmektedir<sup>409</sup>.

miR-101/c-FOS sinyal yolunun mesane kanserinde zayıflamış proliferasyona katkıda bulunduğu iddia edilmiştir<sup>410</sup>. Ek olarak, serviks kanserinin baskılanmış hücre proliferasyonunun, COX-2'nin negatif olarak düzenlenmesi yoluyla yüksek eksprese edilen miR-101 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>385</sup>. Dahası, miR-101, aşağı doğru düzenleyici COX-2 ve SUB1'i kullanarak prostat kanseri (PCa) hücre proliferasyonunu zayıflattığını da doğrulanmıştır<sup>411,412</sup>. Ayrıca, endometriyal kanserde miR-101, MCL-1 seviyesini yeniden düzenledi ve böylece azalmış tümör proliferasyonuna katkıda bulunmaktadır<sup>413</sup>.



miR-101, çeşitli kanserlerin apoptozunda bir promotör olarak işlev görmektedir. MiR-101'in, Janus Kinase 2 (Jak2), eyes absent homolog1 (EYA1) ve cinsiyet belirleme bölgesi Y-box2 (SOX2)'nin ekspresyonunun azalmasıyla doğrudan meme kanserinin hücre apoptozisini arttırdığı doğrulanmıştır<sup>414-416</sup>. Dahası, meme kanseri hücresi apoptozunun kapasitesi daha karmaşık mekanizmalar tarafından düzenlenmiştir. Ayrıntılı olarak, miR-101, hipoksi ile indüklenebilir faktör-1a (HIF1a)'ı negatif olarak düzenleyebilen von Hippel-Lindau (VHL) seviyesini düşürmüş, böylece meme kanserinde HIF1'a bağımlı hücre apoptozisini arttırmıştır<sup>417</sup>. Ek olarak, miR-101, PI3K/Akt/Bcl-2 sinyal yolunun aktivasyonunu aşağıya doğru düzenleyen, Ral bağlama proteini 1 (RLIP76) seviyesinin inhibe edilmesi yoluyla PCa hücre apoptozisinde bir promotör olarak görev yapmaktadır.

miR-101, kaspaz 3'ün arttırılmasını stimüle ederek doğrudan KHDAK hücrelerinin apoptozisini arttırmıştır<sup>418</sup>. Dahası, pankreas duktal adenokarsinomada (PDA) miR-101, ribonükleotit redüktaz M1'in (RRM1) ekspresyonunu bozarak, hücre apoptozisinin indüklenmesine yol açmıştır<sup>419</sup>. Bu arada, miR-101'in, VEGF-C ekspresyon seviyesinin seyreltilmesi yoluyla artmış GC hücresi apoptozisine katkıda bulunduğu bildirilmiştir<sup>420</sup>. Ayrıca, osteosarkomda miR-101'in apoptozu desteklemedeki etkisi, mTOR ve DNA'ya bağımlı protein kinaz katalitik alt ünitesinin (DNA-PKcs) negatif düzenlenişine atfedilir<sup>421,422</sup>.

miR-101'in tümör hücre invazyonu ve metastazını da pek çok kanserde inhibe ettiği gösterilmiştir. miR-101'in osteosarkomda v-fos FBJ ekspresyonunu direk azaltarak metastazı azalttığı gösterilmiştir<sup>381</sup>. Ayrıca, miR-101, miR101-ERK2/c-FOS-AP-1 yolağını düzenleyerek HCC'de tümör hücresi metastazını baskıladığı keşfedilmiştir<sup>380,423</sup>. miR-101, aktivatör protein-1'in (AP-1) iki kritik bileşeni olan ERK2 ve c-FOS ekspresyonunu inhibe ederek, AP-1'e bağlı hücre metastazını baskılamaktadır. Bir transkripsiyon faktörü (TF) olarak AP-1, feed-back döngüsü yaparak miR-101 transkripsiyonunu destekleyebilir.

EZH2 de invazyon ve metastaz sürecine katkıda bulunur. MiR-101'in akciğer kanseri ve OS'de EZH2 seviyesini down regüle ederek hücre metastazını azalttığı belirtilmiştir<sup>389,424</sup>. Ayrıca, epitelial over kanserinde (EOC), miR-101, p21 waf1/cipl'nin transkripsiyonel baskısına aracılık eden EZH2 ekspresyonunu azaltmış ve böylece hücre metastazının inhibisyonuna yol açmıştır<sup>425</sup>. Bu arada, miR-101'in GC'deki EZH2 seviyesini düşürüp, hücre metastazı kapasitesini zayıflatan E-kadherinin restorasyonunu arttırdığı gösterilmiştir<sup>426</sup>. Ayrıca, miR-101'in androjen ve HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 tarafından negatif olarak düzenlendiği ve miR-101'in invazyon ve metastaz sürecinde EZH2'yi azaltarak baskılayıcı olarak işlev gördüğü

anlaşılmıştır<sup>427</sup>. Dahası, tümör yayılımı ve metastaz sürecinde kritik bir rol oynamak için çeşitli sinyal yolları araştırılmaktadır. miR-101, ROCK1'i kullanarak PI3K/AKT ve JAK/STAT sinyal yollarının aktivasyonunu zayıflatarak OS'de tümör metastazını inhibe etmiştir<sup>428</sup>. Ayrıca, LSCC'de miR-101'in CDK8'i hedef alarak Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>429</sup>. Örneğin, KHDAK'de miR-101 seramid sentaz 6'yı (CERS6) hedef alarak hücre metastazını inhibe etmektedir<sup>382</sup>. CERS6, metastaz oluşumu ile bağlantılı olan hücrel membrandaki seramid sentezinde önemli bir rol oynamaktadır<sup>430</sup>.

Ek olarak, miR-101'in, HCC ve OSCC'de çinko parmak E-kutu bağlayıcı homeobox 1 (ZEB1) ekspresyonunu inhibe ederek hücre metastazını azalttığı da kabul edilmiştir<sup>383,431</sup>. ZEB1'in E-kadherini azaltarak ve epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) tetikleyerek organlarda fibrozisi ve kanser metastazı üzerinde büyük bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir<sup>432</sup>. Ayrıca serviks kanserinde miR-101/COX2 düzenleyici ekseninin tümör metastazı ile negatif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir<sup>433</sup>. MiR-101'in EP4 ekspresyonunu azalttığı ve hücre metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir<sup>434</sup>. miR-101'in PTC'de invazyonu baskılanma özelliği, Ubiquitin'e özgü proteaz 22 (USP22) ve Rac1'i negatif olarak modüle etmektedir<sup>435,436</sup>. Hücre metastazını önlemek için miR-101'in mesane kanserindeki miR-101/c-Met yoluna da katıldığı doğrulanmıştır<sup>437</sup>.

Özellikle OSCC'de, miR-101'in metastazı azaltmadaki işlevi, CX kemokin reseptörü 7'yi (CXCR7) hedefleyerek gerçekleştiği kanıtlanmıştır<sup>438</sup>. Ayrıca, miR-101 birikiminin cinsiyet belirleyici bölge Y-box9 proteini (SOX9) seviyesini baskıladığı, böylece glioblastoma multiforme (GBM) 'de invazyon ve metastazı kontrol ettiği gösterilmiştir<sup>439</sup>.

miR-101'in birçok kanser türünde sıkça down regüle edildiğini ve bir çok kritik onkogeni basıklayarak tümör baskılayıcı olarak görev yaptığını göstermiştir. Wang ve arkadaşları, HCC'de, c-Myc'nin, hepatokarsinogenez sırasında miRNA-101'in EZH2 içeren PRC2 kompleksi ile işbirliği yaptığını ve miR-101'in daha düşük ekspresyonunun, kötü prognozla pozitif olarak korele olduğunu tespit etmiştir<sup>440</sup>. Kolorektal kanserde (CRC) miR-101 ekspresyonunun kaybının, kolon kanseri hücrelerinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu aktivasyonunu ve maligniteyi desteklediği bildirilmektedir<sup>441</sup>. Benzer şekilde, glioblastomda, Liu ve arkadaşları, miRNA-101'in, SOX9'u<sup>439</sup> hedefleyerek, glioblastoma invazyonu, migrasyonunu ve anjiogenezi önlediğini göstermiştir<sup>442</sup>. Ayrıca, miRNA-101, glioblastomada GSK3 $\beta$  inhibisyonu ile temozolomid direncini tersine çevirmektedir<sup>443</sup>. Nazofarengeal

karsinomda MicroRNA-101, ITGA3'ü hedef olarak invazyon ve anjiyogenezi inhibe eder ve bunun sistemik uygulaması akciğer metastazını önler<sup>444</sup>.

miR-101 ekspresyonunun azalmasının istenmeyen bir etkisinin, düşük sağ kalım ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir. İki çalışma<sup>445,446</sup>, miR-101 eksprese edildiği vakalarında sağ kalım süresinde belirgin bir avantaj elde edildiğini ve diğer üç çalışmada<sup>429,447-449</sup> da önemli bir katkı bulunmadığı belirtilmiştir.

### 2.3.4. LARENKS SCC'DE MİKRO-RNA EKSPRESYONLARI

Larenks SCC gelişiminin belirli onkogenlerle (örneğin, bcl-2, c-myc, vb.) ve tümör baskılayıcı genlerle (p53, Rb, p16, p21 vb.) ilişkili olduğunu düşünülmekte olup, ancak larenksin moleküler patogenezindeki yerleri net değildir<sup>450</sup>.

Son çalışmalar, miRNA'ların, LSCC gelişimi de dahil olmak üzere pek çok tümörün gelişimi, invazyonu, metastazı ve anjiyogenezinde onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak oynayabileceğini göstermiştir<sup>451</sup>. miRNA'lar, LSCC'nin erken tanısında biyobelirteçler veya terapötik hedef olarak oynayabilir.

miRNA'ların LSCC taraması ve tespitinde mevcut tanı araçlarının önemli bir tamamlayıcısı olabilir. MiRNA'ları çeşitli kanser türleri için erken teşhis ve/veya prognostik belirteç olarak sunan birçok araştırma mevcuttur<sup>452-454</sup>. Literatürde yapılan çalışmalarda, miR-203, miR-205 ve miR-206'nın LSCC'de down regüle edildiğini, miR-21 ve miR-129'un up regüle edildiği tespit edilmiştir<sup>451,455-459</sup>. miRNA-129-5p, LSCC'de tümör supresör APC'yi direkt inhibe ederek, onkogen olarak davranır<sup>458</sup>. miRNA-129-5p'nin LSCC'de kullanılabilecek tedavi hedeflerinden birisi olabileceği öne sürülmektedir. LSCC'de tanımlanmış olan bir başka miRNA da miRNA-203'tür. miRNA-203'ün bir tümör supresör gibi davrandığı, ASAP1'i regüle ederek tümör kök hücrelerinde epitelyal-mezenkimal tranzisyonu (EMT) önleyebileceği gösterilmiştir<sup>451</sup>. Tüm bu bulgular LSCC'de miRNA'ların rolü olabileceğini desteklemektedir.

Bian ve diğ<sup>460</sup>, miR-203'ün, tümör baskılayan etkisini ortaya koymuş olup doğrudan hücrenin hayatta kalmasını hedefleyerek laringeal karsinoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir. miR-203, hematolojik maligniteler, hepatoselüler, özefagus, mesane, kolorektal, mide ve prostat kanserinde, DNp63, AKT2, Src, Runx2, Bcl-w1 ve ABL1 gibi onkogenleri doğrudan hedefleme kabiliyetinin bir sonucu olarak bir tümör baskılayıcı olarak onaylanmıştır<sup>461-468</sup>. Ayaz ve arkadaşlarının çalışmasında, tümör baskılayıcı miR-203,

LSCC'li hastaların plazmasında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Azalan plazma miR-203 ekspresyonu, doku çalışmaları ile bir korelasyon göstermektedir<sup>469</sup>.

Cao ve diğ<sup>470</sup>, altı LSCC ve bitişik normal dokuların miRNA ekspresyonunu miRNA mikroarray aracılığıyla araştırmıştır. LSCC dokusunda tespit edilen miRNA'lardan; miR-21, miR-93, miR-205 ve miR-708'in up regüle ve miR-125b ve miR-145'in down regüle olduğu tespit edilmiştir. Liu ve diğ. miR-21 ekspresyonunun LSCC ve hipofarengeal skuamöz karsinom hücrelerinde up regüle edildiğini göstermiştir.

Hui ve diğ<sup>471</sup>, miR-17-5p, 205 ve 106a'nın formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş, baş boyun skuamöz hücreli karsinom dokusu numunelerinde artmış olduğunu tespit etmişlerdir. miR-17, 18a, 19a/b, 20a ve 92a'yı kodlayan MiR-17-92 kümesinin tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği başka bir çalışmanın sonucunda rapor edilmiştir<sup>472</sup>.

Ayaz ve ekibinin yapmış olduğu araştırmada, miR-21-5p, 205-5p, 17-5p ve 106a-5p'nin sadece LSCC'li hastalarda eksprese edildiği ve miR-125b-5p down regüle olduğu, muhtemelen tümör kaynaklı bir salınım işaret ettiği öne sürülmüştür<sup>469</sup>.

Baş boyun skuamöz hücreli karsinomlarında (HNSCC) miRNA'ların ekspresyonu ile tutarlı olarak, up regüle olan miRNA'ların sayısı, down regüle olan miRNA'ların sayısından daha büyüktür. Bununla birlikte, larengeal SCC'de diferansiyel ekspresyon gösteren son miRNA sayısı HNSCC'ninkinden daha düşüktür. Larengeal SCC'de miR-21, miR-93, miR-205 ve miR-125b'nin diferansiyel ekspresyonu, HNSCC'de miRNA'ların ekspresyonu ile tutarlıdır<sup>471,473,474</sup>.

HNSCC'lerde bulunan mikroRNA ekspresyon profillerine dayanarak, daha önce larengeal SCC'deki miRNA'ların işlevini belirlemek için daha önce araştırmalar yapılmıştır<sup>457,475-478</sup>. Özellikle, miR-21 ve kanserin ilerlemesindeki işlevi birçok alanda geniş ölçüde araştırılmıştır. kanser türleri ve miR-21 anahtar onkojenik faktör olarak kabul edilir<sup>360</sup>. Cao ve ekibi yapmış oldukları çalışmada, gözlemledikleri miR-21'in yükselişinin literatür ile uyumlu olduğunu tespit etmiştir<sup>470</sup>. MiR-21 gibi yaygın olarak kabul görmüş fonksiyona sahip bazı miRNA'lar dışında, tümör genез, progresyon, metastaz ve nüksde spesifik bir miRNA'nın kesin bir rol oynadığını göstermek zordur.

Lui ve ark. PI3K yolu mutasyonlarının larenks kanserinde diğer HNSCC'lerden daha sık olduğunu bildirmiştir<sup>479</sup>. Bu çalışma, PIK3R1 ekspresyonunun, meme kanseri ile ilgili daha önceki çalışmalarda onaylandığı gibi, LSCC örneklerinde önemli ölçüde down regüle edildiğini göstermektedir. Muhtemelen, PIK3R1 ekspresyonunun azalması, PI3K sinyalinin aktivasyonunu azalmasına yol açar ve larengeal kanserin gelişimini provoke eder. HNSCC'de PIK3R1'in mutasyonlarının, meme kanseri ile ilgili yukarıda belirtilen çalışmalarda olduğu gibi aynı down regülasyon mekanizması ile benzer olabileceği ile ilgili çalışmalar mevcuttur<sup>480</sup>.

miRNA tahmini hedef algoritmalarına dayanarak, larenks kanseri örneklerinde normal dokuya kıyasla aşırı eksprese edildiği bulunan miR-525-5p'nin PIK3R1'in potansiyel hedefi olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, test edilen miRNA'ların ve mRNA'ların ekspresyon düzeyi arasında bir ilişki bulunmadığından deneysel doğrulama gereklidir. MiRNA tahmin hedef algoritmalarına göre, hem miR-525-5p hem de miR-21-3p aynı potansiyel hedef gen, FZD4'e sahiptir ve mRNA susturma işleminde sinerjistik etkilerini önerebilecek pozitif korelasyon gösterir. Ancak, hiçbir ilişki bulunamamıştır. FZD4, HNSCC için çok az veri olmasına rağmen, kolon ve prostat da dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde yer alan, GPCR reseptör ailesinin bir üyesi ve Wnt sinyal yolağının başlıca reseptörünün kıvrılmış 4 reseptörünü kodlamaktadır<sup>481</sup>. Wnt yolu, epitelyal-mezenkimal tranzisyon (EMT) ve metastaz gelişiminde rol alır<sup>482</sup>. Bulgular, FZD4 aşırı ekspresyonunu belirleyen bazı çalışmaların aksine olan çalışmalar mevcuttur<sup>483</sup>. Ancak bu çalışmalar diğer kanser türlerini ele almaktadır: prostat<sup>484</sup> ve akut miyeloid lösemi<sup>485</sup>. Genel olarak, kıvrılmış reseptörlerin insan malignitelerindeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir ve HNSCC'de bu reseptör sınıfı ile ilgili sadece birkaç çalışma yayınlanmıştır<sup>486</sup>. Wnt sinyal yolu larengeal kanserinde iyi anlaşılmamıştır. Ayrıca, Galera-Ruiz ve ark. kanonik Wnt yolunun LSCC'de<sup>487</sup> aktif olmadığını, Psyrrı ve ark. bu kanser şeklinde prognostik değerini belirlemiştir<sup>488</sup>. Wnt yolağı ile ilgili bilgi ve kanserdeki rolü sınırlı olduğundan, daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

miRNA ifadesindeki değişiklikler diğer test edilen genlerin ifadesinden daha sık görülür. Ayrıca, miR-21-3p ve miR-139-3p gibi nadiren tümörlerde araştırılan araçların ekspresyonu da larenks kanserinde önemli derecede etkilenir ve bu tür malignitelerde önemli bir rol oynayabilir. Eylemlerinde herhangi bir bağlantı olup olmadığını belirlemek için bu tip tümördeki her iki ipliği de incelemeye ihtiyaç vardır. PIK3R1, HACE1, miR-139-3p ve miR-885-5p, incelenen tümör tipinde tümör baskılayıcı genler olarak işlev görebilirken, miR-21-3p ve miR525-5p onkojenik özelliklere sahip gibi görünmektedir. Cybula ve ekibinin yapmış

oldukları çalışmada, miR-885-5p ve PIK3R1'in larengeal kanser dokusu ve normal mukozanın sınıflandırılmasında en iyi gösterge olduğunu düşündürmektedir<sup>483</sup>.

#### 2.3.4.1 LARENKS SCC'DE miRNA-21

MiR-21-5p, en kapsamlı çalışılan miRNA'lardan biridir ve kanserogenez ve onaylanmış birçok hedefteki rolü açıktır<sup>360,489</sup>. MiR-21-5p, onkogen olarak işlev görmektedir, çünkü baş ve boyun kanserleri de dahil olmak üzere normal dokularla karşılaştırıldığında birçok tümör tipinde aşırı eksprese edilmektedir<sup>350,361</sup>. Önemli olarak, onkojenik bir miRNA olarak, miR-21-5p tümör büyümesi ile birlikte invazyon ve metastazdan sorumlu olabilir. Bu etkiler muhtemelen PDCD4, TPM1, maspin ve PTEN de dahil olmak üzere tümör ilerlemesinin çeşitli aşamaları boyunca çoklu tümör baskılayıcı genlerin eş zamanlı down regülasyonu ile ilişkilidir<sup>490,491</sup>.

Yapılan doku çalışmalarında, miR-21-5p, karşılık gelen normal dokularla karşılaştırıldığında LSCC tümör dokularında belirgin aşırı ekspresyonunu göstermiştir.<sup>457,476</sup>. Hu yayınlamış olduğu araştırmasında, miR-21'in kötü diferansiye LC örneklerinde ekspresyonu arttırdığını, miRNA'nın tümör farklılaşması ile ilişkili olabileceğini öne sürmüş olup; mekanizma henüz açığa kavuşmamıştır. miR-21 ekspresyonunun LSCC için bağımsız prognostik göstergesi olması mümkündür<sup>492</sup>.

MiR-21 korelasyonlu larengeal karsinomun ekspresyonu doğrulanmıştır. Yüksek miR-21 ekspresyonunun LSCC riski ile ilişkili olabileceğini düşünülmektedir. MiR-21 ekspresyon seviyesi, larengeal kanser tanısının önemli bir biyolojik belirteci olabilir<sup>493</sup>. Ren ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada miR-21'in, LSCC tümör dokularında aşırı eksprese edildiği ve miR-21'in down regülasyonu, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve LSCC'nin apoptozunu indüklediği görülmüştür. Ayrıca artmış miR-21, kötü diferansiyasyon, T3-4 evresi, lenf nodu metastazı ve ileri klinik evrelerle korele olduğunu tespit etmişlerdir. Bu etkiler muhtemelen Ras yolunun miR-21 tarafından düzenlenmesi ile ilgilidir. Bu nedenle miR-21, LSCC'de onkojenik bir rol oynayabilir ve miR-21'i hedef alan gen terapisi, LSCC tedavisi için potansiyel bir alternatif strateji olarak araştırılmaktadır<sup>457</sup>.

miR-21'in, Ras ifadesinin<sup>457</sup> düzenlenmesi yoluyla hücre apoptozunu inhibe ederek güçlü bir LSCC tümör promotörü olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. deneysel kanıtlar fosfataz

tensin homolog (PTEN) geninin LSCC'de<sup>459</sup> apoptoz ile ilişkili olduğunu ve miR - 21 ve miR - 221<sup>369,494</sup> tarafından hedeflenebileceğini ortaya koymuştur. Bu bulgu, bir HEp-2 LSCC hücre hattında PTEN geninin ve proteinin düşük ekspresyonunun gözlemlenmesi ile tutarlıdır<sup>459,495</sup>. PTEN, Akt'in<sup>496</sup> önemli bir negatif düzenleyici faktörüdür ve PTEN'in aktivasyonu, LSCC metastazı ile ilişkilidir<sup>497</sup>. Sonuç olarak, Akt, kanser hücrelerinde<sup>498</sup> tümör baskılayıcı gen tümör proteini p53'ün (TP53) ekspresyon seviyesini negatif olarak kontrol eder.

LSCC'de miR-21 ve miR-221'in aynı anda aşırı ekspresyonunun, PTEN tarafından Akt'nin negatif regülasyonunu bir bütün olarak zayıflatabileceğini ve böylece p53'ün proapoptotik miRNA'ların transkripsiyonunu aktive etmesine neden olamayacağını gösterir. Bu hipoteze dayanarak, Kan ve ekibi yapmış oldukları çalışmada miR-21 ve miR-221'in birlikte inhibisyonunun, LSCC'de oluşturulan anti-apoptotik ve proapoptotik miRNA'lar arasındaki dengesizliğin tersine çevrilmesine katkıda bulunabileceğini düşünmüştür. Mevcut hipotezin geçerliliğini araştırmak için, anti-miRNA oligonükleotid (AMO) -21 ve AMO-221'in LSCC Hep-2 hücre hattına birlikte transfekte edildiği in vitro bir deney yapmışlardır. Hücrel apoptoz ve PTEN ve fosforile-Akt (p-Akt) protein ekspresyon seviyeleri izlemiştir. Bu çalışmanın sonucunda iki miRNA'nın her birinin, insan LSCC dokusunda<sup>470</sup> fazla ifade edildiği, PTEN-Akt sinyal yolunda<sup>369,494</sup> PTEN'i hedeflediği ve çoklu biyolojik modülleri<sup>499</sup> paylaştığı doğrulanmıştır. PTEN'in Akt'nin<sup>494</sup> önemli bir negatif düzenleyici faktörü olduğu, Akt'nin aşırı aktivasyonunun LSCC metastazı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu tespit edilmiştir<sup>495</sup>. Akt aşırı ekspresyonu nihayetinde tümör baskılayıcı gen TP53'ün ekspresyonunda bir artışa yol açar<sup>496</sup>. Kısaca, PTEN-Akt sinyalinin yoğunluğunun azalması, PTEN-Akt sinyalinin bu akış aşağı p53 yolu üzerindeki önleyici rolünü azaltmıştır. AMO-21 ve AMO-221'in birlikte transfeksiyonu ile PTEN'in miRNA aracılı regülasyonunu bloke ederek p53 ekspresyonunda belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, mevcut bulgular, p53'ün Hep-2 hücrelerinde anti-apoptotik ve proapoptotik miRNA'ların fonksiyonlarının dengesi üzerinde merkezi bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

#### **2.3.4.2. LARENKS SCC'DE miRNA-101**

miRNA-101'in tümör supresör olarak işlev gördüğü tespit edilmiştir. miRNA-101'in ektopik ekspresyonunun, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu, bu işlemlerde görevli olan genleri düzenleyerek inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu genler COX-2, EZH2, Mcl-1, Fos, Stathmin1 ve c-Met'tir<sup>378,390,408,412,413,437,500-504</sup>.

CDK8, CDK ailesinin bir üyesidir ve mayalardan insanlara kadar pek çok canlıda transkripsiyonel düzenlemede rol alır<sup>505,506</sup>. CDK8 aktivitesini düzenleyen mekanizmalar henüz tam olarak açıklanmamıştır. Mevcut deliller CDK8'in pek çok transkripsiyon işleminde ko-aktivatör olarak görev yaptığı yönündedir. Örneğin, CDK8, Wnt/ $\beta$ -catenin sinyal yolundaki transkripsiyon seviyesindeki biyolojik işlemlerde önemli bir düzenleyici rol oynar ve insan kolon kanserinde bir proto-onkogen olduğu öne sürülmektedir<sup>507-509</sup>. Bilgisayar analizleri CDK8 mRNA'sının 3' translasyon olmayan ucunun (UTR), miRNA-101 için hedef bölge olabileceği olasılığı ortaya çıkmıştır<sup>510,511</sup>. miRNA-101'in eksojen ekspresyonunun CDK8 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir<sup>429</sup>.

CDK8 Wnt/ $\beta$ -catenin yolağı, p53 ağı, serum cevap ağı ve tiroid hormon bağımlı transkripsiyon yolağında önemli bir ko-aktivatördür<sup>507,508,512-515</sup>. Bu fonksiyon Mediator kompleksinin CDK8/kinaz modülü aracılığı ile gerçekleştirilir. Mediator kompleksi, 25-30 proteinden oluşan pek çok alt üyeden oluşan bir kompleks olup, RNA polimeraz II (pol II) transkripsiyonunun regülasyonunda merkezi rol oynamaktadır. Mediator kompleksinin yapısı ve fonksiyonu memeliler arasında son derece katı bir şekilde korunmuş olup 4 belirgin modüle ayrılır; baş, orta, kuyruk ve CDK8/kinaz modülü<sup>516-521</sup>. Mediator kompleks çekirdeğine bağlanma, kompleks ve Pol II arasındaki etkileşimi önler<sup>521</sup>.  $\beta$ -catenin, MED12'nin C-terminal alanı ile etkileşime giren işlem alanı aracılığıyla, memeli hücrelerinde  $\beta$ -catenin / T hücre faktörü hedef genlerine Mediator kompleksleri oluşturur<sup>505</sup>. CDK8, Mediator kompleksindeki rolüne bağlı olarak  $\beta$ -catenin aracılı transkripsiyon hedeflerini doğrudan aktive edebilir. Bununla birlikte, CDK8'in, işlevini inhibe etmek için bir apoptoz aktivatörü olan E2F1'i fosforile ederek,  $\beta$ -catenin-bağımlı transkripsiyon hedeflerini dolaylı olarak aktive edebileceğini gösteren kanıtlar da vardır<sup>521,522</sup>. Ek olarak CDK8'in hücre çoğalmasında, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücre diferansiyasyonunda önemli rol oynamaktadır<sup>523-530</sup>. Bu düzenleme, kısmen, histon H3 proteinlerinin fosforilasyonu aracılığı ile yapılmaktadır<sup>531,532</sup> [38-39]. Li ve ekibinin çalışmasında lentivirüsün miRNA-101 ile transdüksiyonunun CDK8 ve  $\beta$ -catenin ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir<sup>429</sup>.

$\beta$ -catenin, Wnt/ $\beta$ -catenin yolağında görevli önemli bir sinyal molekülüdür. Wnt/  $\beta$ -catenin yolağı hem normal gelişim hem de tümörögenizde önemli rol oynar. Proliferasyon, migrasyon, apoptoz ve diferansiyasyon basamaklarının pek çok adımında yer alır<sup>533-535</sup>. Wnt sinyal yolağının LSCC gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir<sup>458</sup>.



miRNA-101 artışı hücre siklusunu G1/S sınırında durdurmaktadır. Ayrıca miRNA-101,  $\beta$ -katenini azaltmakla kalmayıp, Hep2 hücre kültüründe siklin D1'in azalmasına sebep olmuştur. Siklin D1, hücre siklusunun G1/S geçişini sağlayan önemli bir promotördür, ayrıca Wnt/  $\beta$ -katenin yolağının önemli bir transkripsiyonel hedef genidir<sup>536</sup>. Tüm bu veriler miRNA-101'in LSCC'de tümörogenezi basıklayacağını göstermektedir.

Li ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada miRNA-101'in LSCC dokusunda down regüle olduğu ve bunun normal dokularda tespit edilmediği raporlanmıştır. miRNA-101'in eksojen ekspresyonu, hücre proliferasyonunda azalmaya, Hep-2 hücre serisinde invazyonun azalmaya ve in vivo olarak xenogreft tümör büyümesini yavaşlatmaya sebep olur. LSCC hastalarında miRNA-101'in düşük seviyelerde ekspresyonu progresyonsuz sağ kalımın kısılması ile ilişkilendirilmiştir<sup>429</sup>.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Toplanması

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi kliniğine Mart 2017-Eylül 2019 tarihleri arasında başvuran, larenks SCC nedeniyle tanı almış, 18 yaşından büyük ve cerrahi olarak tedavi edilmiş olan hastalar dahil edilmiştir. Benzer demografik özellikte, larenks patolojisi olmayan, malignite tanısı almamış hastalar kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Her iki gruptan alınan periferik kan örnekleri çalışılmak üzere İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na gönderilmiştir.

Çalışma için İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik kurulundan onay alınmıştır (Tarih: 3/12/2019 Sayı: 83045809-604.01.02).

### 3.2.Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi kliniğinde Mart 2017-Eylül 2019 tarihleri arasında başvuran, larenks SCC nedeniyle tanı almış 46 hasta ve kontrol grubu olarak 30 gönüllü hasta çalışmaya dahil edildi.

#### Çalışmaya Alınma Kriterleri:

Hasta grubu için;

- Larenks SCC tanısı almış
- 18 yaşından büyük
- Primer cerrahi ile tedavi edilecek olan hastalar olarak belirlenmiş olup,

Kontrol grubu için;

- 18 yaşından büyük
- Herhangi bir malignite tanısı almamış
- Radyoterapi, kemoterapi öyküsü olmayan gönüllü bireyler olarak belirlenmiştir.

#### Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- 18 yaşından küçük hastalar
- Gebelik veya çocuk emzirme
- Ek bir nörolojik veya psikiyatrik hastalığı olmak
- Daha önce geçirilmiş baş boyun kanseri öyküsü olan hastalar

- Başka bir organ sistemine ait kanser öyküsü olan hastalar
- Baş boyun bölgesine radyoterapi almış olan hastalar
- Primer radyoterapi/kemoterapi öyküsü olan ve/veya neoadjuvan kemoterapi almış olan hastalar
- Kronik hepatit ve/veya kronik böbrek yetmezliği tanısı almış hastalar olarak belirlenmiştir.

### **3.3.Örnek Toplama ve Analizlenen Parametreler**

Ameliyat öncesi sabah aç karnına kan örnekleri kırmızı kapaklı tüplere toplandı. 30 dk. oda sıcaklığında dik vaziyette bekletildi. Soğutmalı santrifüj cihazında 1000-2000xg'de 10 dk. santrifüj edilerek kan pıhtısı uzaklaştırıldı. Kan alma tüpünün üst kısmında biriken serumlar 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine bölünerek izolasyona kadar -80 °C derin dondurucu'da saklandı.

### **3.4.MikroRNA Analizi**

EXTRACTME miRNA KIT (BLIRT, POLONYA) kullanılarak kit protokolüne göre serum örneklerinden miRNA izolasyonu yapıldı. NanoDrop Spektrofotometre (ThermoFisher Scientific, ABD) cihazı kullanılarak miRNA miktarları belirlendi. WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) (Wizbio Solutions, KORE) ve miRNA Expression qPCR Assay Kit (Suarge Biyoteknoloji, TÜRKİYE) içindeki hsa-miR-21-5p ve hsa-mir-101-3p'ye özgü Real time (RT) primerler kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. miRNA ifade düzeyleri miRNA Expression qPCR Assay Kit (Suarge Biyoteknoloji, TÜRKİYE) içindeki miRNA'lara özgü Forward ve Reverse Primerler ve AMPLIFYME SYBR Universal Mix (BLIRT, Polonya) kullanılarak StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, USA) cihazında ölçüldü. miRNA-21-5p ve miRNA-101-3p ifade düzeyleri RNU44 ve hsa-miR-16 endojen kontroller ile yapılan ikili normalizasyona göre  $\Delta\Delta C_T$  yöntemi ile belirlendi.

### **3.5.İstatistiksel Analiz**

Değerlerin normal dağılıma uygunluklarının analizi Shapiro-Wilk testi ile analiz edilmiştir. Normal dağılıma uygun olmayan değerler için non parametrik, normal dağılım gösteren değerler için parametrik analiz yöntemleri kullanılmıştır. Var-yok incelemelerinde x2 testi ve Fisher'in kesinlik testi (Fisher's exact test) kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasındaki ekspresyon farklılıkları Student t testi ile karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında miRNA ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amacıyla  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  eşitliği kullanılarak sonuçlar kat

değişimi (fold changes) olarak verilmiştir. miRNA ekspresyonlarının tanısal güçleri Receiver operating characteristic (ROC) eğrilerinden elde edilen duyarlılık, özgüllük ve cut-off değerlerine göre değerlendirilmiştir. Risk analizi ise lojistik regresyon analizi ile gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler SPSS v.20 paket programında yapılmıştır.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **3.6. Hastaların değerlendirilmesi**

Hastalar 2018 AJCC-HNS TNM evreleme gruplarına göre evrenip, histopatolojik grade ve patoloji özelliklerine göre gruplandırılacak, bu gruplar ile mi-RNA düzeyleri arasındaki korelasyon, kontrol grubu ve hasta grubu arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



## 4. BULGULAR

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi kliniğine Mart 2017-Eylül 2019 tarihleri arasında başvuran, larenks SCC nedeniyle tanı almış 46 hasta ve kontrol grubu olarak 30 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir.

Hastalar ve kontrol grubunda yer alan hastaların tamamı erkektir. Hastaların ve kontrol gruplarının demografik özellikleri Tablo 14’te verilmiştir.

**Tablo 14: Hastaların demografik özellikleri**

|                                  | Hasta (n=46) | Kontrol (n=29) | p     |
|----------------------------------|--------------|----------------|-------|
| Yaş                              | 61,20 ± 8,83 | 53,48 ± 6,34   |       |
| Sigara kullanımı<br>(Evet/Hayır) | 46/0         | 11/18          | 0,000 |
| Alkol kullanımı<br>(Evet/Hayır)  | 11/35        | 1/28           | 0,019 |

Hasta grubunun yaş ortalaması 61,2±8,8’dir (minimum: 44, maksimum:82), kontrol grubu yaş ortalaması 53,6±6,2’dir (minimum:40, maksimum:64). Hasta ve kontrol grubunun tamamı erkektir. Sigara ve alkol kullanımı değerlendirildiğinde hasta grubundaki hastaların tamamı sigara (n=46), ve %19,6’sı (n=9) alkol kullanmakta, kontrol grubunda ise bireylerin %40’ı (n=12) sigara, %6,7’si (n=2) alkol kullanmaktaydı. Sigara kullanan ve alkol kullanan hasta bireylerin sayısı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla p<0,001 ve p<0,05).

Hasta grubuna ait klinik bilgiler Tablo 15’te verilmiştir.

**Tablo 15: Hasta grubu klinik özellikleri ve TNM evrelemeleri**

|                       | n               | %    |
|-----------------------|-----------------|------|
| <b>Tümör Yeri</b>     | Glottik 29      | 63,0 |
|                       | Supraglottik 14 | 30,4 |
|                       | Transglottik 3  | 6,5  |
| <b>Klinik T</b>       | 1 11            | 23,9 |
|                       | 2 16            | 34,8 |
|                       | 3 15            | 32,6 |
|                       | 4 4             | 8,7  |
| <b>Klinik N</b>       | 0 36            | 78,3 |
|                       | 1 2             | 4,3  |
|                       | 2a 1            | 2,2  |
|                       | 2b 2            | 4,3  |
|                       | 2c 3            | 6,5  |
|                       | 3b 2            | 4,3  |
| <b>Klinik M</b>       | 0 46            | 100  |
| <b>Klinik Evre</b>    | 1 11            | 23,9 |
|                       | 2 13            | 28,3 |
|                       | 3 12            | 26,1 |
|                       | 4a 8            | 17,4 |
|                       | 4b 2            | 4,3  |
| <b>Patolojik T</b>    | 1 12            | 26,1 |
|                       | 2 15            | 32,6 |
|                       | 3 11            | 23,9 |
|                       | 4a 8            | 17,4 |
| <b>Patolojik N</b>    | 0 36            | 78,3 |
|                       | 1 1             | 2,2  |
|                       | 2a 2            | 4,3  |
|                       | 2c 1            | 2,2  |
|                       | 3b 6            | 13,0 |
| <b>Patolojik M</b>    | 0 46            | 100  |
| <b>Patolojik Evre</b> | 0 1             | 2,2  |
|                       | 1 12            | 26,1 |
|                       | 2 11            | 23,9 |
|                       | 3 8             | 17,4 |
|                       | 4a 8            | 17,4 |
|                       | 4b 6            | 13,0 |

Hastaların tümörleri glottik %63 (n=29), supraglottik %30,4 (n=14) ve transglottik %6,5 (n=3) olarak değerlendirilmiştir. Hastalar klinik T evresine göre değerlendirildiğinde T1 %23,9 (n=11), T2 %34,8 (n=16), T3 %32,6 (n=15) ve T4 %8,7 (n=4) olarak dağılmıştır. Hastalar klinik N evresine göre değerlendirildiğinde N0 %78,3 (n=36), N1 %4,3 (n=2), N2a %2,2 (n=1), N2b %4,3 (n=2), N2c %6,5 (n=3) ve N3b %4,3 (n=2) olarak dağılmıştır. Hastaların hiçbirinde klinik uzak metastaz yoktur. Klinik evrelere göre gruplandırıldığında Evre I %23,9 (n=11), Evre II %28,3 (n=13), Evre III %26,1 (n=12), Evre IVa %17,4 (n=8) ve Evre IVb %4,3 (n=2) olarak dağılmıştır. Hastalar patolojik T evresine göre değerlendirildiğinde T1 %26,1 (n=12), T2 %32,6 (n=15), T3 %23,9 (n=11) ve T4a %17,4 (n=8) olarak dağılmıştır. Hastalar patolojik N evresine göre değerlendirildiğinde N0 %78,3 (n=36), N1 %2,2 (n=1), N2a %4,3 (n=2), N2c %2,2 (n=1) ve N3b %13 (n=6) olarak dağılmıştır. Hastaların hiçbirinde patolojik uzak metastaz yoktur. Patolojik evrelere göre gruplandırıldığında Evre 0 %2,2 (n=1), Evre I %26,1 (n=12), Evre II %23,9 (n=11), Evre III %17,4 (n=8), Evre IVa %17,4 (n=8) ve Evre IVb %13 (n=6) olarak dağılmıştır.

Hastaların ileri patolojik değerlerine göre özellikleri Tablo 16'da verilmiştir.

**Tablo 16: Hastaların ileri patolojik değerleri**

|                             |     | n  | %    |
|-----------------------------|-----|----|------|
| <b>Grade</b>                | Gx  | 11 | 23,9 |
|                             | G1  | 5  | 10,8 |
|                             | G2  | 20 | 43,4 |
|                             | G3  | 10 | 21,7 |
| <b>Perinöral İnvazyon</b>   | Yok | 39 | 84,8 |
|                             | Var | 7  | 15,2 |
| <b>Kan Damarı İnvazyonu</b> | Yok | 37 | 80,4 |
|                             | Var | 9  | 19,6 |
| <b>Lenfatik İnvazyon</b>    | Yok | 21 | 45,7 |
|                             | Var | 25 | 54,3 |
| <b>Kartilaj İnvazyonu</b>   | Yok | 28 | 60,9 |
|                             | Var | 18 | 39,1 |
| <b>Metastatik LN</b>        | Yok | 36 | 78,3 |
|                             | Var | 10 | 21,7 |
| <b>ENİ</b>                  | Yok | 38 | 82,6 |
|                             | Var | 8  | 17,4 |

ENİ: Ekstranodal invazyon

Hastaların patolojik özellikleri değerlendirildiğinde histolojik grade dağılımı; 11 hastada grade tanımlanamamış (%23,9), 5 hasta G1 (%10,8), 20 hasta G2 (%43,4) ve 10 hastada G3 (%21,7) olarak tanımlanmıştır. 39 hastada (%84,8) perinöral invazyon tespit edilmemiş olup 7 hastada (%15,2) tespit edilmiştir. 37 hastada (%80,4) kan damarı invazyonu tespit edilmemiş olup, 9 hastada (%19,6) tespit edilmiştir. 21 hastada (%45,7) lenfatik invazyon tespit edilmemiş olup, 25 hastada (%54,3) tespit edilmiştir. 28 hastada (%60,9) kartilaj invazyonu tespit edilmemiş olup, 18 hastada (%39,1) tespit edilmiştir. 36 hastada (%78,3) lenf nodu metastazı tespit edilmemiş olup, 10 hastada (%21,7) tespit edilmiştir. 38 hastada (%82,6) ekstranodal invazyon tespit edilmemiş olup, 8 hastada (%17,4) tespit edilmiştir.



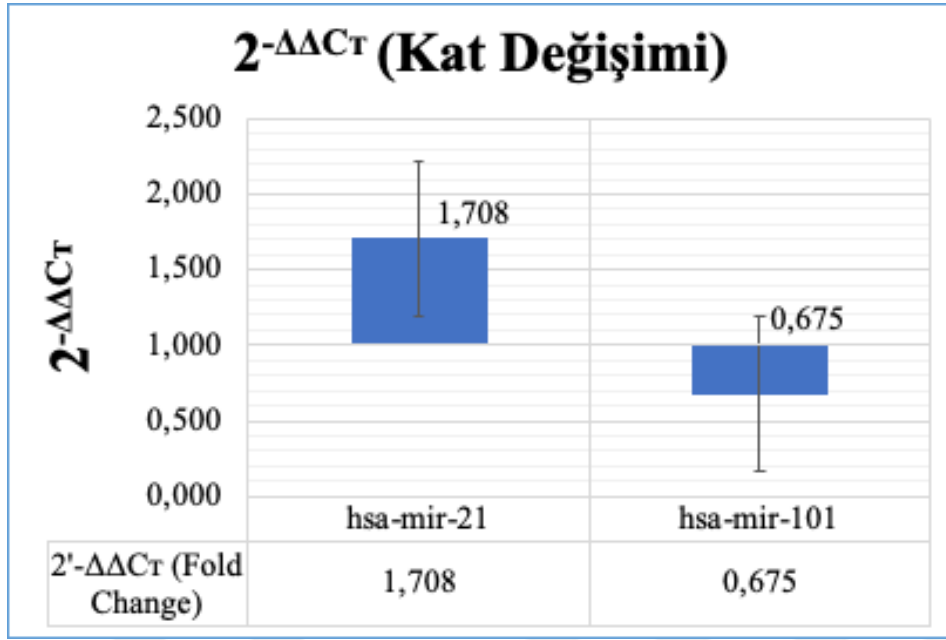
Hasta ve kontrol grubunun miR-21 ve miR-101 ekspresyon düzeyleri ve kat değişim değerleri Tablo 17’de verilmiştir.

**Tablo 17: Hasta ve kontrol grubunun miR-21 ve miR-101 ekspresyon düzeyleri ve kat değişim değerleri**

|         | Hasta (n=46)<br>( $\Delta C_T$ ) | Kontrol (n=30)<br>( $\Delta C_T$ ) | $2^{-\Delta\Delta C_T}$ | p     |
|---------|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|-------|
| miR-21  | $1,190 \pm 1,439$                | $1,962 \pm 0,764$                  | 1,708                   | 0,010 |
| miR-101 | $-1,417 \pm 1,164$               | $-1,983 \pm 0,662$                 | 0,675                   | 0,009 |

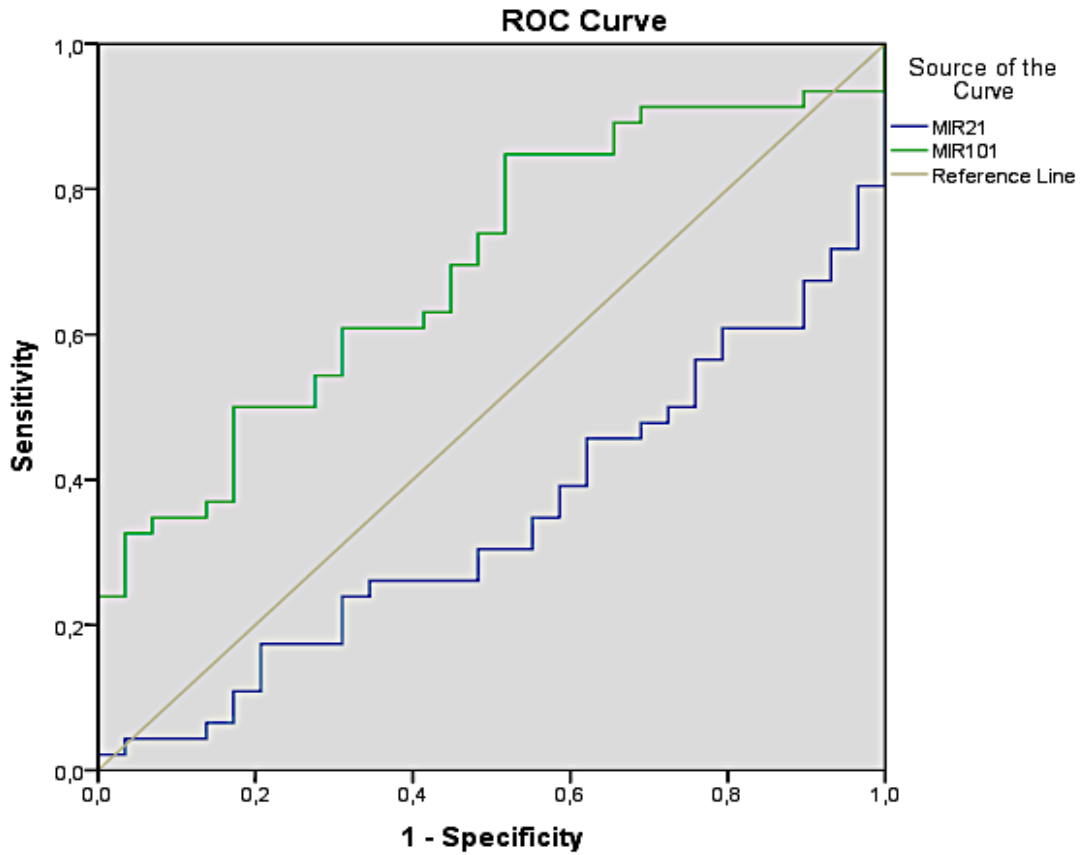
Hasta bireylerin miR-21 ekspresyon düzeyleri ( $\Delta C_T$ ) ortalaması  $1,190 \pm 1,439$ ; Kontrol grubuna ait bireylerin miR-21 ekspresyon düzeyleri ( $\Delta C_T$ ) ortalaması  $1,962 \pm 0,764$  olarak hesaplandı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 17) .  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  yöntemi ile iki grup arasında kat değişimi incelendi, hasta grubunda miR-21’in 1,708 kat up regüle olduğu tespit edildi (Şekil 5).

Hasta bireylerin miR-101 ekspresyon düzeyleri ( $\Delta C_T$ ) ortalaması  $-1,417 \pm 1,164$ ; Kontrol grubuna ait bireylerin miR-101 ekspresyon düzeyleri ( $\Delta C_T$ ) ortalaması ise  $-1,983 \pm 0,662$  olarak hesaplandı ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (Tablo 17).  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  yöntemi ile iki grup arasında kat değişimi incelendi, hasta grubunda miR-101’in 0,675 kat down-regüle olduğu tespit edildi (Şekil 5).



**Şekil 5: Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla miR-21 ve miR-101'in kat değişim grafiği**

Hastaların serum miR-21 ve miR-101 ekspresyonunun ROC eğrisi analizi ve kesim değerleri Şekil 6 ve Tablo 18'de verilmiştir.



**Şekil 6: Serum miR-21 ve miR-101 ekspresyonunun ROC eğrisi analizi**

**Tablo 18: Serum miR-21 ve miR-101 ekspresyonunun ROC eğrisi analizi ve kesim değerleri**

| Değişkenler | AUC   | p     | 95% CI      |             | Kesim değeri<br>(Cut-off) | Spesifite | Sensitivite |
|-------------|-------|-------|-------------|-------------|---------------------------|-----------|-------------|
|             |       |       | Lower Bound | Upper Bound |                           |           |             |
| miR-21      | 0,343 | 0,023 | 0,221       | 0,466       | 2,162                     | 0,690     | 0,239       |
| miR-101     | 0,694 | 0,005 | 0,575       | 0,813       | -2,237                    | 0,483     | 0,848       |

ROC analizi sonuçlarına göre (Şekil 6 ve Tablo 18) hasta ile kontrol grup karşılaştırılmasında, ekspresyonları arasında anlamlı kat farkı olan miRNA'lar (miR-21 ve miR-101) belirlenerek ROC eğrileri çizildi ve miRNA'ların duyarlılığı ve tanısal güçleri karşılaştırıldı. Bu iki grup arasında, miR-21'in AUC'si 0,343 olarak düşük ancak istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ); miR-101'in AUC'si ise 0,694 olarak ve istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu. miR-21 ve miR-101 için kesim değerleri ise Youden indeksine göre belirlendi. Elde edilen kesim değerlerine göre risk analizi gerçekleştirildi. Buna göre, miR-21'in kesim değerinden büyük olması durumunda hastalık riskini anlamlı olarak artmadığı ( $p > 0,05$ ), ancak miR-101'in kesim değerinden büyük olması durumunda hastalık riskini 5,20 kat arttırdığı bulundu ((95 % CI: 1,76-15.39;  $p < 0,01$ )).

Sigara ve alkol kullanımı ile hastalık risk analizi Tablo 19'da verilmiştir.

**Tablo 19: Sigara ve Alkol Kullanımı ile Larenks SCC Gelişmesi Risk Analizi Sonuçları**

| Değişkenler      | Odds Ratio | 95% CI        | p             |
|------------------|------------|---------------|---------------|
| Sigara Kullanımı | 149.61     | 8,38- 2671,25 | <b>0,0007</b> |
| Alkol Kullanımı  | 8.80       | 1.07-72.34    | <b>0.0430</b> |
| miR-21 > 2,162   | 0,698      | 0,25-1,97     | 0,497         |
| miR-101 > -2,237 | 5.20       | 1,76-15.39    | <b>0.0029</b> |

Sigara kullanımı ve alkol kullanımı hastalık riski açısından incelendiğinde hastalık riskinin anlamlı olarak arttığı bulundu (Sırasıyla 149,61 kat  $p < 0,001$  ve 8,80 kat  $p < 0,05$ ).

Hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri ile miR-21 ve miR-101 ekspresyonları arasında korelasyon verileri tablo 20’de verilmiştir.

**Tablo 20: Demografik veriler ile miRNA ekspresyonları arasında korelasyon verileri**

|         |   | miR-101 | YAŞ    | SİGARA | ALKOL  |
|---------|---|---------|--------|--------|--------|
| miR-21  | r | 0,222   | -0,247 | -0,144 | -0,045 |
|         | p | 0,248   | 0,197  | 0,455  | 0,816  |
| miR-101 | r | -       | -0,090 | 0,153  | -0,068 |
|         | p | -       | 0,643  | 0,428  | 0,727  |
| YAŞ     | r | -0,090  | -      | -0,087 | 0,215  |
|         | p | 0,643   | -      | 0,649  | 0,254  |
| SİGARA  | r | 0,153   | -0,087 | -      | -0,152 |
|         | p | 0,428   | 0,649  | -      | 0,424  |

Hasta ve kontrol grubunda miR-21 ve miR-101 ekspresyon düzeyleri ile yaş, sigara ve alkol kullanımı arasında korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Hasta grubunun klinik verileri ile miR-21 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon değerleri Tablo 21’de verilmiştir.

**Tablo 21: Klinik veriler ile miR-21 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon verileri**

|        |   | miR-101 | KLİNİK T | KLİNİK EVRE | PATOLOJİK T | PATOLOJİK EVRE | LENFATİK İNV | KARTİLAJ İNV |
|--------|---|---------|----------|-------------|-------------|----------------|--------------|--------------|
| miR-21 | r | 0,343*  | 0,473**  | 0,334*      | 0,439**     | 0,399**        | 0,380**      | 0,372*       |
|        | p | 0,020   | 0,001    | 0,023       | 0,002       | 0,006          | 0,009        | 0,011        |

\*\* .  $p < 0.01$  (2-tailed).

\*.  $p < 0.05$  (2-tailed).

Hasta grubunda miR-21 ekspresyon düzeyleri ile Klinik T ( $p=0,001$ ), Klinik Evre ( $p=0,023$ ), Patolojik T ( $p=0,002$ ), Patolojik evre ( $p=0,006$ ), Lenfatik invazyon ( $p=0,009$ ) ve kartilaj invazyonu ( $p=0,011$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon bulundu (Tablo 21).

Hasta grubunun klinik verileri ile miR-101 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon değerleri Tablo 22’da verilmiştir.

**Tablo 22: Klinik veriler ile miR-101 ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon verileri**

|         |   | miR-21 | PATOLOJİK N |
|---------|---|--------|-------------|
| miR-101 | r | 0,343* | 0,300*      |
|         | p | 0,020  | 0,043       |

\*\*.  $p < 0.01$  (2-tailed).

\*.  $p < 0.05$  (2-tailed).

Hasta grubunda miR-101 ekspresyon düzeyleri ile miR-21 ekspresyonu ( $p=0,02$ ) ve Patolojik N ( $p=0,043$ ) arasında istatistiksel olarak anlamlı zayıf pozitif korelasyon bulundu (Tablo 22).

## 5. TARTIŞMA

Larenks kanseri, dünya çapında en sık görülen ikinci baş boyun skuamöz hücreli karsinomudur<sup>537</sup>. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2011 yılında larenks karsinomu tanısı alan 12,740 yeni hastanın (erkek 10,160 ve kadın 2,580) olduğu tahmin edilmektedir (toplam yeni kanser vakalarının% 0,7'sini oluşturmaktadır). Aynı zamanda Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı tahmin edilen ölümlerin yaklaşık% 0,6'sından sorumludur<sup>538</sup>. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2007 yılında yaklaşık 11.300 larenks kanser vakası teşhis edildi ve bunların da yaklaşık 3660 ölümlerle sonuçlanacağı tahmin edilmektedir<sup>19</sup>. Türkiye'de en sık görülen ikinci malignitedir ve erkeklerde ölümün %7'sinden sorumludur<sup>20</sup>.

Doğru tedavinin seçilebilmesi için doğru histopatolojik tanı konması, primer tümörün yayılımının doğru bir şekilde tespit edilmesi ve doğru TNM evrelemesi yapılması şarttır. Doğru evrelemenin önemi azımsanmamalıdır bu sebeple hastanın tedavi öncesi değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Genel olarak erken evre tümörlerin (Evre I ve II) tedavisinde tek aşamalı tedavi yani tek başına RT veya cerrahi tercih edilirken ileri evre tümörlerde (Evre III ve IV) kombine tedavi yani cerrahiyi takiben RT veya kemoradyoterapi (KRT) veya KRT/RT'yi takiben kurtarma cerrahisi uygulanmaktadır. Uygulanacak tedavi yöntemine karar verilirken hastalığın evresinin yanı sıra hastaya ait faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Hastaya ait faktörlerden bazıları; yaş, eşlik eden komorbiditeler, genel sağlık durumu, performans durumu, ses ile ilgili beklentiler, tedavi ve takibe uyumluluk, sigara veya alkol kullanımı, beslenme durumu, kişinin tedavi merkezine olan uzaklığı ve hastanın tercihleridir. Tümöre ait faktörler tümörün histopatolojisi, primer tümörün kaynaklandığı bölge, TNM evresi, yeterli rezeksiyon sınırı sağlanıp sağlanamayacağı, ekstrakapsüler yayılım, perinöral invazyon varlığı, lenfovasküler invazyon varlığıdır. Tedavi ve takibi etkileyebilecek diğer faktörler tedavinin yapılacağı merkez ve ekibin cerrahi ve onkoloji tecrübe ve yeterliliğidir.

Tedavi yöntemlerindeki çeşitlilik her ne kadar gelişmiş olsa da hastaların prognozunu önceden tayin etmek için herhangi bir belirteç bulunmamaktadır. Hastalığın tanısı konduktan sonra seçilen tedavi yöntemine göre belirli aralıklarla takibi yapılmaktadır. Benzer lezyon ile aynı tedaviyi almış bireylerin prognozları birbirinden farklılık gösterebilmektedir. Günümüzde bu farklılığa sebep olan nedenler bilinmemektedir.

Son yıllarda moleküler biyolojinin en önemli keşiflerinden (buluşlarından) biri miRNA'lardır. Son on yılda, miRNA'lar kanserde önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir<sup>539</sup>. miRNA'lar hedef mRNA'larının ekspresyonunu kontrol ederek tümör büyümesi, invazyon, anjiyogenez ve immün yanıtta büyük öneme sahip oldukları gösterilmiştir<sup>540,541</sup>. Larenks kanseri'nin moleküler mekanizmaları hala açıklanamamıştır. Pek çok araştırma, kusurlu DNA onarım mekanizmalarının, bozulmuş hücre döngüsünün ve metaloproteinazların anormal ekspresyonunun larenks kanser oluşumu riskini artırabildiğini göstermiştir<sup>457,476,542,543</sup>. Son yıllarda, miRNA'ların larenks kanser gelişimindeki rolü hakkında artan sayıda çalışmalar bildirilmiştir.

Yu ve ark. miRNA'ların (miR-21, miR-106b ve miR-375) LSCC tanısı için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. LSCC hastaların dokularında ve eşleştirilmiş tümör olmayan dokulardaki miR-21, miR-106b ve miR-375'in ekspresyon seviyelerini RT-PCR ile kantitatif olarak analiz ettiler. miR-21 ve miR-106b, kanser dokularında up-regüle, miR-375 down-regüle bulunmuştur. Ayrıca, miR-21 ve miR-106b düzeyleri, iyi diferansiye ve displazi dokularla karşılaştırıldığında orta derecede diferansiye kanser dokularında anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Ayrıca onların düzeyleri lenf nodu metastazı ve TNM evreleri ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Araştırmacılar bu ön çalışmada miR-21, miR-106b ve miR-375'in LSCC tanısı için yeni tümör belirteçleri olabileceğini öne sürmüşlerdir<sup>539</sup>.

miRNA'ların LSCC taraması ve tespitinde mevcut tanı araçlarının önemli bir tamamlayıcısı olabilir. MiRNA'ları çeşitli kanser türleri için erken teşhis ve/veya prognostik belirteç olarak sunan birçok araştırma mevcuttur<sup>452-454</sup>. Literatürde yapılan çalışmalarda, miR-203, miR-205 ve miR-206'nın LSCC'de down regüle edildiğini, miR-21 ve miR-129'un up regüle edildiği tespit edilmiştir<sup>451,455-459</sup>. miRNA-129-5p, LSCC'de tümör supresör APC'yi direk inhibe ederek, onkogen olarak davranır<sup>458</sup>. miRNA-129-5p'nin LSCC'de kullanılabilecek tedavi hedeflerinden birisi olabileceği öne sürülmektedir. LSCC'de tanımlanmış olan bir başka miRNA da miRNA-203'tür. miRNA-203'ün bir tümör supresör gibi davrandığı, ASAP1'i regüle ederek tümör kök hücrelerinde epitelyal-mezenkimal tranzisyonu (EMT) önleyebileceği gösterilmiştir<sup>451</sup>. Tüm bu bulgular LSCC'de miRNA'ların rolü olabileceğini desteklemektedir.

miRNA'ların laringeal skuamöz hücreli karsinom (LSCC) tanısında kullanılıp kullanılmayacağı büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu tez çalışması LSCC'de dolaşımdaki miRNA-21-5q ve miRNA-101-3p değerlerinin tanı, prognoz, sigara ve hayatta kalıma olan

etkilerini düzenlemek amacıyla planlanmıştır. Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında ikili endojen Kontroller (RNU44 ve mir-16) ile yapılan normalizasyonun ardından hasta grubunda kontrole göre miR-21 ekspresyon düzeyleri 1,3 kat artış göstermiştir. Çalışmanın bulguları, son zamanlarda yapılan diğer miR-21 çalışmalarının bulguları ile uyumlu görünmektedir.

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, baş ve boyun kanseri gelişimi ile tütün ve alkol kullanımı arasında nedensel bir bağlantı olduğunu belirtmek için kanıtların yeterli olduğu sonucuna varmıştır. Risk, tütün veya alkol tüketiminin yoğunluğu ve süresi ile orantılıdır ve kullanımın bırakılmasından sonra risk yavaş yavaş azalır, ancak en az 20 yıl boyunca bazal düzeyine geri dönmez. Tütün maruziyetinin (örneğin, puroya karşı sigara, filtreden geçirilmiş sigaralara karşı filtrelenmiş sigaralar) türünde risk farklılıkları vardır, ancak en önemli faktörler tüketilen tütün miktarı ve maruz kalma süresidir. Tütün ve alkol, kanser riskini arttırmak için sinerjik olarak hareket eder<sup>21-23</sup>. Çalışmamızda biz de benzer bulgular tespit ettik. Hasta grubunda sigara ve alkol kullanım düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı tespit edildi. Bizim çalışmamızda da yapılan risk analizi sonuçlarına göre sigara kullanımının LSCC gelişim riskini 149,1 kat ( $p<0,001$ ), alkol kullanımının da LSCC gelişim riskini 8,8 kat ( $p<0,05$ ) arttırdığı bulunmuş olup bu risk artışları anlamlı olarak değerlendirilmiştir ve bu bulgular literatür ile uyumludur.

Larenks kanseri için başlıca risk faktörlerinden biri sigara içmektir. Birçok çalışma, sigara içmenin birçok miRNA'nın ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, araştırmacılar sigara dumanının miRNA deregülasyonu ile karsinogeneze neden olduğunu göstermiştir. Sigara içimi miRNA genlerindeki, özellikle tek nükleotid polimorfizm bölgelerindeki genetik veya epigenetik hasarı etkiler<sup>544</sup>. Ek olarak, tütün dumanı ile miRNA düzensizliğinin, hücre döngüsünü, hücre büyümesini, apoptozu veya anjiyogenezini düzenleyen ana yol olan P53 yolu da dahil olmak üzere miRNA'lar tarafından düzenlenen bozucu mekanizmalara neden olabileceği gösterilmiştir<sup>490</sup>.

Bizim çalışmamızda sigara ve alkol kullanımı ile miR-21 ( $p>0,05$ ) ve miR-101 ( $p>0,05$ ) ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Fakat sigara ve alkol kullanımının LSCC riskini anlamlı düzeyde arttırdığı görülmüştür. Larenks kanserinde en önemli prognostik prediktör klinik evredir. İleri T ve/veya N evreleri, sağ kalımda azalma ile direk ilişkilidir<sup>183,184</sup>. Sağ kalımın ön görülmesinde N evresi, T evresine göre daha belirleyicidir<sup>185</sup>. N negatif hastaların sağ kalım oranları N pozitif hastalardan daha yüksektir<sup>184</sup>. Servikal lenf nodu metastazı olan vakalarda histopatolojik olarak ektranodal invazyonun olması prognozu daha



da kötü etkiler<sup>186,187</sup>. En kötü prognostik faktör uzak metastaz olup 5 yıllık sağ kalım oranı %10'dur<sup>63</sup>.

Çalışmamızda miR-21 ekspresyon düzeyleri ile klinik T evresi arasında anlamlı bir korelasyon görülmektedir (p=0,001). Hastalarda T evresi prognozu belirleyen en önemli kriterdir. T evresi ilerledikçe sağ kalım belirgin bir şekilde azalmaktadır. Klinik evre grupları ile de miR-21 ekspresyon düzeyleri anlamlı bir korelasyon görülmüştür (p=0,023). Evre grupları da T evresi gibi sağ kalımın önemli belirleyicilerindedir. Benzer ilişki patolojik T ve patolojik evre (sırasıyla p=0,002 ve p=0,006) arasında da görülmüştür. Patolojik N evresi ile zayıf pozitif korelasyon bulunmuştur (p=0,02). T evresi, N evresini belirleyen en önemli evre değeridir. Hasta grubundaki örneklem sayısının az olması sebebiyle anlamlı bir ilişki kurulamadığı düşünülmekte olup bu konuda daha geniş gruplarda analiz yapılması gerektiği düşünülmektedir. MiR-21 korelasyonlu laringeal karsinomun ekspresyonu doğrulanmıştır. Yüksek miR-21 ekspresyonunun LSCC riski ile ilişkili olabileceğini düşünülmektedir. MiR-21 ekspresyon seviyesi, laringeal kanser tanısının önemli bir biyolojik belirteci olabilir<sup>493</sup>.

Ren ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada miR-21'in, LSCC tümör dokularında aşırı eksprese edildiği ve miR-21'in down regülasyonu, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve LSCC'nin apoptozunu indüklediği görülmüştür. Ayrıca artmış miR-21, kötü diferansiyasyon, T3-4 evresi, lenf nodu metastazı ve ileri klinik evrelerle korele olduğunu tespit etmişlerdir. Bu etkiler muhtemelen Ras yolunun miR-21 tarafından düzenlenmesi ile ilgilidir. Bu nedenle miR-21, LSCC'de onkojenik bir rol oynayabilir ve miR-21'i hedef alan gen terapisi, LSCC tedavisi için potansiyel bir alternatif strateji olarak araştırılmaktadır<sup>457</sup>. Literatür verileri ile birlikte değerlendirildiğinde miR-21 ile LSCC arasındaki korelasyon literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Klinik veriler ile miR-101 ekspresyonu arasındaki ilişki yalnızca patolojik N evresi arasında görülmüştür (p=0,043). Patolojik N sağ kalımın ön görülmesinde önemli kriterlerden biridir fakat yalnızca boyun tedavisinde cerrahi seçilen hastalarda bu verilerin elde edilmesi gerektiğinden tüm LSCC hastaları için kullanılabilecek bir klinik veri değildir. miR-101'in diğer klinik veriler ile miR-21 gibi bir ilişkisi kurulamamış olsa da yapılan risk analizinde miR-101'in kesim değerinden büyük olması durumunda hastalık riskini 5,20 kat arttırdığı bulunmuş olup genel veriler ile de miR-101 düzeylerinin anlamlı olması bu miRNA'nın potansiyel bir prognostik faktör olabileceğini göstermiştir. ((95 % CI: 1,76-15.39; p<0,01).

miRNA-101'in tümör supresör olarak işlev gördüğü tespit edilmiştir. miRNA-101'in ektopik ekspresyonunun, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu, bu işlemlerde görevli olan genleri düzenleyerek inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu genler COX-2, EZH2, Mcl-1, Fos, Stathmin1 ve c-Met'tir<sup>378,390,408,412,413,437,500-504</sup>. miRNA-101'in eksojen ekspresyonunun CDK8 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir<sup>429</sup>. Bizim çalışmamızda da miR-101 anlamlı olarak hasta grubunda down regüle olmuştur.

Li ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada miRNA-101'in LSCC dokusunda down regüle olduğu ve bunun normal dokularda tespit edilmediği raporlanmıştır. miRNA-101'in eksojen ekspresyonu, hücre proliferasyonunda azalmaya, Hep-2 hücre serisinde invazyonun azalmaya ve in vivo olarak xenograft tümör büyümesini yavaşlatmaya sebep olur. LSCC hastalarında miRNA-101'in düşük seviyelerde ekspresyonu progresyonsuz sağ kalımın kısalması ile ilişkilendirilmiştir<sup>429</sup>. Sonuçlarımız literatür sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur.

En önemli histopatolojik prognostik faktör lenf nodu metastazı olan olgularda ekstranodal invazyon olmasıdır. ENİ varlığı tüm baş boyun bölgesinden kaynaklanan SCC'lerde olduğu gibi larenks SCC'de de sağ kalımı düşüren en önemli bulgudur<sup>186,187</sup>.

Tümörün histolojik tipi de önemli bir prognostik faktördür. SCC'nin pek çok alt tipi vardır ve herbirinin biyolojik davranışı farklıdır. Verrüköz SCC daha az agresif ve iyi prognozlu iken bu durum adenoskuamöz karsinom için tam tersidir.

Tümörün histolojik gradelemesi<sup>201,202</sup> (iyi diferansiye, orta diferansiye veya az diferansiye), invazyon paterni<sup>49,203</sup> (infiltratif veya ekspansif), perinöral ve/veya lenfovasküler invazyon varlığı<sup>204</sup> lokal kontrol ve sağ kalımı etkilemektedir.

Patolojik veriler ile miR-21 ekspresyon düzeyleri arasında da zayıf pozitif korelasyon görülmüştür. Lenfatik invazyon (p=0,009), kartilaj invazyonu (p=0,011) olan vakalarda miR-21'in, invazyon olmayan vakalara göre anlamlı olduğu görülmektedir. Tümörde, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon ve kartilaj invazyonu tespit edilmesi tümörün ileri evre özellikleri arasında değerlendirilmekte olup bu özelliklere sahip tümörlerde prognoz daha kötü olduğu ve adjuvan tedavi gerektiği bilinmektedir.

Arantes ve ark. baş ve boyun yassı epitel hücreli karsinom (HNSCC)'lu hastalarda miR-21, organ koruma protokolüne verilen tedavi yanıtı ile negatif ilişkili buldular. Aynı zamanda yaptıkları çok değişkenli analizde, yaş, tümör bölgesi, p16 immüno-ekspresyonu ve tümör

rezektabilitesi için ayarlanan bir modelde, yüksek miR-21 ekspresyonunun, klinik evre IV ile birlikte organ koruma protokolüne zayıf yanıtın bağımsız bir öngörücüsü olarak kaldığını göstermişlerdir. Yüksek miR-21 ekspresyonu olan hastalarda daha kötü sağ kalım görülmüştür<sup>543</sup>. Bizim çalışmamızda çok değişkenli Cox regresyon analizi ayrıca miR-21 ve klinik evre IV'ü bağımsız prognostik faktörler olarak gösterdi (model yaş, tümör bölgesi, tümör rezektabilitesi ve 'tarama' veya 'validasyon' için ayarlandı). Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları, miR-21 ekspresyonunun değerlendirilmesinin, organ koruma protokolleri uygulanan HNSCC hastaları için tedavi planlaması ve prognoz tahmini için önemli bir araç olabileceğini düşündürmektedir.

Li ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada miRNA-101'in LSCC dokusunda down regüle olduğu ve bunun normal dokularda tespit edilmediği raporlanmıştır. miRNA-101'in eksojen ekspresyonu, hücre proliferasyonunda azalmaya, Hep-2 hücre serisinde invazyonun azalmaya ve in vivo olarak xenograft tümör büyümesini yavaşlatmaya sebep olur. LSCC hastalarında miRNA-101'in düşük seviyelerde ekspresyonu progresyonsuz sağ kalımın kısalması ile ilişkilendirilmiştir<sup>429</sup>.

MiR-21 ile LSCC arasındaki ilişkiyi araştıran pek çok literatür çalışması olsa da miR-101 bu alanda yeni bir miRNA'dır. Bu sebeple LSCC ile ilişkisini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya gerek vardır. Bizim çalışmamızda örneklem grubunun göreceli olarak az olması sebebiyle prognostik değerler ve miR-21 ve miR-101 arasında anlamlı olarak zayıf korelasyonlar gözlenmiş olup, LSCC hastalarında bu iki miRNA'nın kontrol grubuna göre anlamı olarak yüksek bulunmaları da bu miRNA'ların LSCC için önemli birer biyobelirteö olabileceği görüşümüzü desteklemektedir.

LSCC biyokimyasına dair elimizdeki veriler her ne kadar kısıtlı olsa da miRNA'lar bu alanda önemli birer potansiyel adaydır. Bu konudaki önemlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha büyük hasta grupları ile çalışmalar yapılması gerekmektedir.

## 6. SONUÇ

Baş boyun kanserleri içerisinde önemli bir yer tutmakta olan larenks kanseri hastaları oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Larenks kanseri kendi içerisinde homojen bir grup değildir. Kendi içerisinde pek çok alt grubu olan benzer özelliklere sahip olsa bile biyolojik davranışı farklı olabileb bir kanser grubudur.

Günümüzde bu farklılığa sebep olabilecek pek çok sebep öne sürülse de hiçbirisinin sonucu kesin değildir. Son yirmi yılda gündeme gelen mikroRNA'ların bu farklılıkları ayırt etmede, hastaların takip ve prognozunda büyük ölçüde yardımcı olabileceği görüşü mevcuttur. mikroRNA'ların larenks kanseri ile olan ilişkisi yapılan pek çok çalışmada açığa çıkarılmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla pek çok mikroRNA araştırılmıştır.

Bizim çalışmamızda değerlendirmiş olduğumuz mikroRNA-21'in hastaların prognostik özellikleri ile olan pozitif korelasyonu oldukça dikkat çekmiştir. Pek çok kanserin tümörögenezinde suçlanan bu mikroRNA için yapılan çalışmalardaki artış, kanser gelişiminde bu biyobelirtecin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Biz de yapmış olduğumuz çalışmamızda benzer sonuçlar elde ettiğimiz için bu biyobelirtecin önümüzdeki yıllarda kanser tanı ve takibinde önemli rol oynayabilecek bir biyobelirteç olduğunu düşünmekteyiz. mikroRNA-101 daha yeni bir biyobelirteç olup kanser gelişimindeki yeri henüz net değildir. Daha çok tümör baskılayıcı bir rolü olduğu öne sürülen bu yeni biyobelirtecin çalışmalarımızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre klinik bir önemi olabileceğini düşünsek de bu önemi belirlemek için daha geniş hasta gruplarında bu hipotezin tekrar denemesi gerektiği görüşündeyiz.

Sonuç olarak kanser biyokimyası araştırmaları hız kazanmış olup, bize kanser davranışı hakkında daha detaylı bilgiler kazandırmaktadır. Bu alanda önemli bir rol üstlendiği düşünülen mikroRNA'ların katkısının anlaşılabilmesi için daha büyük hasta gruplarında çalışma yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKÇA

1. Williams DJ. Grant's Atlas of Anatomy, Eleventh Edition by Anne M.R. Agur and Arthur F. Dalley. *Clin Anat.* 2006. doi:10.1002/ca.20338
2. Sadler TW. *Langman's Essential Medical Embryology.*; 2012.
3. Keith L Moore, T V N Persaud MGT. *Before We Are Born: Essentials of Embriology and Birth Defects.*; 2016.
4. *Clinical Head and Neck Anatomy for Surgeons.*; 2015. doi:10.1201/b19589
5. Moore KL, Dalley AF, Agur AM. *Moore Clinically Oriented Anatomy Seventh Edition.*; 2014. doi:10.5005/jp/books/11723\_2
6. Remacle M, Van Haverbeke C, Eckel H, et al. Proposal for revision of the European Laryngological Society classification of endoscopic cordectomies. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2007. doi:10.1007/s00405-007-0279-z
7. Amin MB, Edge S, Greene F, et al. AJCC Cancer Staging Manual Eighth edition. *Springer Int Publ.* 2017. doi:10.1007/978-3-319-40618-3
8. Veer V. SURGICAL ANATOMY OF THE HEAD AND NECK. P Janfaza, J B Nadol Jr, R J Galla, R L Fabian, W W Montgomery. Harvard University Press, 2011. ISBN 978 0 67405 803 3 pp 932 Price £259.95 US\$350. *J Laryngol Otol.* 2012. doi:10.1017/s0022215112001478
9. Pressman J, Dowdy A, Libby R, Fields M. Lxxxix further studies upon the submucosal compartments and lymphatics of the larynx by the injection of dyes and radioisotopes. *Ann Otol Rhinol ... Laryngol.* 1956. doi:10.1177/000348945606500409
10. Watkinson J, Gilbert R. *Stell & Maran's Textbook of Head and Neck Surgery and Oncology.*; 2011. doi:10.1201/b13389
11. Imanishi N, Kondoh T, Kishi K, Aiso S. Angiographic study of the superior laryngeal artery. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2009. doi:10.2535/ofaj.86.61

12. Souvirón R, Marañillo E, Vázquez T, et al. Proposal of landmarks for clamping neurovascular elements during endoscopic surgery of the supraglottic region. *Head Neck*. 2013. doi:10.1002/hed.22902
13. Mukherji SK, Armao D, Joshi VM. Cervical nodal metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck: What to expect. *Head Neck*. 2001. doi:10.1002/hed.1144
14. Paraskevas GK, Raikos A, Ioannidis O, Brand-Saberi B. Topographic anatomy of the internal laryngeal nerve: Surgical considerations. *Head Neck*. 2012. doi:10.1002/hed.21769
15. Barnes L, Tse LLY, Hunt JL, et al. Tumours of the hypopharynx, larynx and trachea. In: *WHO Classification of Tumour Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours*. ; 2005. doi:10.1016/j.urology.2004.09.048
16. Ferlito A, Friedman I. Neoplasms of the Larynx. In: Ferlito A, ed. *Squamous Cell Carcinoma*. Edinburgh: Churchill-Livingstone; 1993:113-133.
17. Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, et al. Laryngeal cancer in the United States: Changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope*. 2006. doi:10.1097/01.mlg.0000236095.97947.26
18. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*. 2007. doi:10.3322/canjclin.57.1.43
19. Roach M, Alexander M, Coleman JL. The prognostic significance of race and survival from laryngeal carcinoma. *J Natl Med Assoc*. 1992.
20. Elci OC, Akpınar-Elci M, Blair A, Dosemeci M. Risk of Laryngeal Cancer by Occupational Chemical Exposure in Turkey. *J Occup Environ Med*. 2003. doi:10.1097/01.jom.0000085890.50021.6f
21. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. *Cancer Res*. 1988.

22. Elwood JM, Pearson JCG, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer*. 1984. doi:10.1002/ijc.2910340504
23. Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Bugel I, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *Eur J Cancer Prev*. 2004. doi:10.1097/01.cej.0000130017.93310.76
24. Ward PH, Hanson DG. REFLUX AS AN ETIOLOGICAL FACTOR OF CARCINOMA OF THE LARYNGOPHARYNX. *Laryngoscope*. 1988. doi:10.1288/00005537-198811000-00009
25. Morrison MD. Is chronic gastroesophageal reflux a causative factor in glottic carcinoma? *Otolaryngol Neck Surg*. 1988. doi:10.1177/019459988809900403
26. Qadeer MA, Colabianchi N, Strome M, Vaezi MF. Gastroesophageal reflux and laryngeal cancer: Causation or association? A critical review. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 2006. doi:10.1016/j.amjoto.2005.07.010
27. Galli J, Cammarota G, Calò L, et al. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2002. doi:10.1097/00005537-200210000-00030
28. Gillison ML. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000. doi:10.1093/jnci/92.9.709
29. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human Papillomavirus in Non-Oropharyngeal Head and Neck Cancers: A Systematic Literature Review. *Head Neck Pathol*. 2012. doi:10.1007/s12105-012-0368-1
30. Duray A, Descamps G, Arafa M, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol*. 2011. doi:10.3892/ijo.2011.1031
31. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymański M, Polz D. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: Clinico-pathological evaluation. In: *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. ; 2008. doi:10.1007/s00405-007-0569-5

32. Morshed K. Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol.* 2010. doi:10.1002/jmv.21749
33. Stephen JK, Chen KM, Shah V, et al. Human papillomavirus outcomes in an access-to-care laryngeal cancer cohort. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States).* 2012. doi:10.1177/0194599811434482
34. Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilas G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2005. doi:10.1007/s00405-005-0916-3
35. Wight R, Paleri V, Arullendran P. Current theories for the development of nonsmoking and nondrinking laryngeal carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003. doi:10.1097/00020840-200304000-00002
36. Olsen J, Sabroe S. Occupational causes of laryngeal cancer. *J Epidemiol Community Health.* 1984. doi:10.1136/jech.38.2.117
37. Maier H, Gewelke U, Dietz A, Heller WD. Risk Factors of Cancer of the Larynx: Results of the Heidelberg Case Control Study. *Otolaryngol Neck Surg.* 1992. doi:10.1177/019459989210700411
38. Goodman M, Morgan RW, Ray R, Malloy CD, Zhao K. Cancer in asbestos-exposed occupational cohorts: A meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 1999. doi:10.1023/A:1008980927434
39. Koufman JA, Burke AJ. The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 1997.
40. Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996. doi:10.1093/jnci/88.8.530
41. Trizna Z, Schantz SP. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am.* 1992.



42. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJP, et al. Role of Genetic Factors in the Etiology of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 1995. doi:10.1001/archotol.1995.01890020019005
43. Chainani-Wu N. Diet and oral, pharyngeal, and esophageal cancer. *Nutr Cancer*. 2002. doi:10.1207/S15327914NC4402\_01
44. Boeing H, Dietrich T, Hoffmann K, et al. Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aero-digestive tract: The prospective EPIC-study. *Cancer Causes Control*. 2006. doi:10.1007/s10552-006-0036-4
45. Meyskens FL, Szabo E. Diet and cancer: The disconnect between epidemiology and randomized clinical trials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0666
46. Gonzalez CA. The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Public Health Nutr*. 2006. doi:10.1079/phn2005934
47. Kattan MW, Hess KR, Amin MB, et al. American Joint Committee on Cancer acceptance criteria for inclusion of risk models for individualized prognosis in the practice of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2016. doi:10.3322/caac.21339
48. Shanmugaratnam K, Shanmugaratnam K. Histological Classification of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear. In: *Histological Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear*. ; 1991. doi:10.1007/978-3-642-84474-4\_2
49. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch*. 1995. doi:10.1007/BF00203395
50. Zarovnaya E, Black C. Distinguishing pseudoepitheliomatous hyperplasia from squamous cell carcinoma in mucosal biopsy specimens from the head and neck. *Arch Pathol Lab Med*. 2005. doi:10.1043/1543-2165(2005)129[1032:DPHFSC]2.0.CO;2
51. Wenig BM. Necrotizing sialometaplasia of the larynx: A report of two cases and a review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 1995. doi:10.1093/ajcp/103.5.609

52. Barnes, L; Eveson JW; Reichart P SD. World Health Organization classification: Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours. Presented at the: 2005.
53. Shaha AR, Shah JP. Carcinoma of the subglottic larynx. *Am J Surg*. 1982. doi:10.1016/0002-9610(82)90422-6
54. Garas J, McGuirt WF. Squamous cell carcinoma of the subglottis. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 2006. doi:10.1016/j.amjoto.2005.05.004
55. Gregor RT. Ventriculosaccular carcinoma of the larynx. *South African J Surg*. 1990.
56. Spriano G, Piantanida R, Pellini R, Muscatello L. Elective treatment of the neck in squamous cell carcinoma of the larynx: Clinical experience. *Head Neck*. 2003. doi:10.1002/hed.10170
57. Esposito EDAVE, Motta S, Cassiano B, Motta G. Occult lymph node metastases in supraglottic cancers of the larynx. *Otolaryngol Neck Surg*. 2001. doi:10.1067/mhn.2001.113146
58. Gallo O, Fini-Storchi I, Napolitano L. Treatment of the contralateral negative neck in supraglottic cancer patients with unilateral node metastases (N1-3). *Head Neck*. 2000. doi:10.1002/1097-0347(200007)22:4<386::AID-HED12>3.0.CO;2-5
59. Hicks J, Kollmorgen DR, Kuriakose MA, et al. Patterns of nodal metastasis and surgical management of the neck in supraglottic laryngeal carcinoma. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1999. doi:10.1016/S0194-5998(99)70125-7
60. Redaelli De Zinis LO, Nicolai P, Tomenzoli D, et al. The distribution of lymph node metastases in supraglottic squamous cell carcinoma: Therapeutic implications. *Head Neck*. 2002. doi:10.1002/hed.10152
61. Waldfahrer F, Hauptmann B, Iro H. Lymph node metastasis of glottic laryngeal carcinoma. *Tumor Diagnostik und Ther*. 2005. doi:10.1055/s-2004-826075
62. Lamprecht J, Lamprecht A, Kurten-Rothes R. Mediastinal involvement in carcinoma of the subglottis, hypopharynx and cervical oesophagus. *Laryngol Rhinol Otol*. 1987.

63. Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope*. 2001. doi:10.1097/00005537-200106000-00028
64. Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM. Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2006. doi:10.1001/archotol.132.7.762
65. Oosterkamp S, De Jong JMA, Van Den Ende PL, Manni JJ, Dehing-Oberije C, Kremer B. Predictive value of lymph node metastases and extracapsular extension for the risk of distant metastases in laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2006. doi:10.1097/01.mlg.0000240263.05198.a0
66. Pitman KT, Johnson JT. Skin metastases from head and neck squamous cell carcinoma: Incidence and impact. *Head Neck*. 1999. doi:10.1002/(SICI)1097-0347(199909)21:6<560::AID-HED10>3.0.CO;2-Q
67. Zeitels SM, Vaughan CW. Preepiglottic space invasion in "early" epiglottic cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1991. doi:10.1177/000348949110001001
68. Zinreich SJ. Imaging in laryngeal cancer: Computed tomography, magnetic resonance imaging, positron emission tomography. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002. doi:10.1016/S0030-6665(02)00037-3
69. 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. doi:10.1148/radiology.194.3.7862960
70. Harnsberger H, Hudgins PA, Wiggins R. *Head and Neck Top 100 Diagnoses*. Philadelphia: WB Saunders; 2002.
71. Sakai F, Sone S, Kiyono K, et al. MR evaluation of laryngohypopharyngeal cancer: Value of gadopentetate dimeglumine enhancement. *Am J Neuroradiol*. 1993.
72. Carriero A, Scarabino T, Vallone A, Cammisa M, Salvolini U, Bonomo L. MRI T-staging of laryngeal tumours: Role of contrast medium. *Neuroradiology*. 2000. doi:10.1007/s002340050017

73. Zimmer LA, Branstetter BF, Nayak J V., Johnson JT. Current use of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography and combined positron emission tomography and computed tomography in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*. 2005. doi:10.1097/01.MLG.0000181495.94611.A6
74. Gordin A, Daitzchman M, Doweck I, et al. Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging in patients with carcinoma of the larynx: Diagnostic accuracy and impact on clinical management. *Laryngoscope*. 2006. doi:10.1097/01.mlg.0000197930.93582.32
75. Zanation AM, Sutton DK, Couch ME, Weissler MC, Shockley WW, Shores CG. Use, accuracy, and implications for patient management of [18F]-2-fluorodeoxyglucose-positron emission/computerized tomography for head and neck tumors. *Laryngoscope*. 2005. doi:10.1097/01.MLG.0000163763.89647.9F
76. Loevner LA, Yousem DM, Montone KT, Weber R, Chalian AA, Weinstein GS. Can Radiologists Accurately Predict Preepiglottic Space Invasion with MR Imaging? *Am J Roentgenol*. 1997. doi:10.2214/ajr.169.6.9393190
77. Becker M, Zbären P, Delavelle J, et al. Neoplastic invasion of the laryngeal cartilage: Reassessment of criteria for diagnosis at CT. *Radiology*. 1997. doi:10.1148/radiology.203.2.9114116
78. Zbären P, Becker M, Läng H. Pretherapeutic staging of laryngeal carcinoma: Clinical findings, computed tomography, and magnetic resonance imaging compared with histopathology. *Cancer*. 1996. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1263::AID-CNCR6>3.0.CO;2-J
79. Ferlito A, Rinaldo A. The pathology and management of subglottic cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2000. doi:10.1007/s004050050217
80. Castelijns JA, Becker M, Hermans R. Impact of cartilage invasion on treatment and prognosis of laryngeal cancer. *Eur Radiol*. 1996. doi:10.1007/BF00181135
81. Kau RJ, Alexiou C, Stimmer H, Arnold W. Diagnostic procedures for detection of lymph node metastases in cancer of the larynx. *ORL*. 2000. doi:10.1159/000027746

82. Fleming AJ, Smith SP, Paul CM, et al. Impact of [18F]-2-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography on previously untreated head and neck cancer patients. *Laryngoscope*. 2007. doi:10.1097/MLG.0b013e31805d017b
83. Narula AA, Sheppard IJ, West K, Bradley PJ. Is emergency laryngectomy a waste of time? *Am J Otolaryngol Neck Med Surg*. 1993. doi:10.1016/0196-0709(93)90005-R
84. Yotakis J, Davris S, Kontozoglou T, Adamopoulos G. Evaluation of risk factors for stomal recurrence after total laryngectomy. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996. doi:10.1111/j.1365-2273.1996.tb01317.x
85. Fagan JJ, Loock JW. Tracheostomy and peristomal recurrence. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996. doi:10.1111/j.1365-2273.1996.tb01080.x
86. Rubin J, Johnson JT, Myers EN. Stomal recurrence after laryngectomy: Interrelated risk factor study. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 1990. doi:10.1177/019459989010300523
87. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*. 2010. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
88. De Juan J, García J, López M, et al. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: A proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2013. doi:10.1001/jamaoto.2013.2666
89. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017. doi:10.3322/caac.21389
90. Prabhu RS, Magliocca KR, Hanasoge S, et al. Accuracy of computed tomography for predicting pathologic nodal extracapsular extension in patients with head-and-neck cancer undergoing initial surgical resection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.10.002
91. Wreesmann VB, Katabi N, Palmer FL, et al. Influence of extracapsular nodal spread extent on prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016. doi:10.1002/hed.24190

92. Prabhu RS, Hanasoge S, Magliocca KR, et al. Extent of pathologic extracapsular extension and outcomes in patients with nonoropharyngeal head and neck cancer treated with initial surgical resection. *Cancer*. 2014. doi:10.1002/cncr.28596
93. Dünne AA, Müller HH, Eisele DW, Keßel K, Moll R, Werner JA. Meta-analysis of the prognostic significance of perinodal spread in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) patients. *Eur J Cancer*. 2006. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.062
94. Myers EN, Wagner RL, Johnson JT. Microlaryngoscopic surgery for T1 glottic lesions: A cost-effective option. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1994. doi:10.1177/000348949410300104
95. Fein DA, Mendenhall WM, Parsons JT, Million RR. T1-T2 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiotherapy: A multivariate analysis of variables potentially influencing local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993. doi:10.1016/0360-3016(93)90005-G
96. Jørgensen K, Godballe C, Hansen O, Bastholt L. Cancer of the larynx: Treatment results after primary radiotherapy with salvage surgery in a series of 1005 patients. *Acta Oncol (Madr)*. 2002. doi:10.1080/028418602317314091
97. Cellai E, Frata P, Magrini SM, et al. Radical radiotherapy for early glottic cancer: Results in a series of 1087 patients from two Italian radiation oncology centers. I. The case of T1N0 disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.05.018
98. Marshak G, Brenner B, Shvero J, et al. Prognostic factors for local control of early glottic cancer: The Rabin Medical Center retrospective study on 207 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999. doi:10.1016/S0360-3016(98)00547-1
99. Frata P, Cellai E, Magrini SM, et al. Radical radiotherapy for early glottic cancer: Results in a series of 1087 patients from two Italian radiation oncology centers. II. The case of T2N0 disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.05.013
100. Stutsman AC, McGavran MH. Ultraconservative Management of Superficially Invasive Epidermoid Carcinoma of the True Vocal Cord. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1971. doi:10.1177/000348947108000412

101. Thomas J V., Olsen KD, Neel HB, Desanto LW, Suman VJ. Early Glottic Carcinoma Treated With Open Laryngeal Procedures. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 1994. doi:10.1001/archotol.1994.01880270012003
102. Giovanni A, Guelfucci B, Gras R, Yu P, Zanaret M. Partial frontolateral laryngectomy with epiglottic reconstruction for management of early-stage glottic carcinoma. *Laryngoscope.* 2001. doi:10.1097/00005537-200104000-00020
103. Ambrosch P. The role of laser microsurgery in the treatment of laryngeal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007. doi:10.1097/MOO.0b013e3280147336
104. Steiner W, Ambrosch P, Rödel RMW, Kron M. Impact of anterior commissure involvement on local control of early glottic carcinoma treated by laser microresection. *Laryngoscope.* 2004. doi:10.1097/00005537-200408000-00031
105. Mendenhall WM, Amdur RJ, Morris CG, Hinerman RW. T1-T2N0 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiation therapy. *J Clin Oncol.* 2001. doi:10.1200/JCO.2001.19.20.4029
106. Jackson Dickens W, Cassisi NJ, Million RR, Bova FJ. Treatment of early vocal cord carcinoma: A comparison of apples and apples. *Int J Radiat Oncol.* 1980. doi:10.1016/0360-3016(80)90510-6
107. Howell Burke D, Peters LJ, Goepfert H, Oswald MJ. T2 Glottic Cancer: Recurrence, Salvage, and Survival After Definitive Radiotherapy. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 1990. doi:10.1001/archotol.1990.01870070078014
108. Harwood AR, Deboer G. Prognostic factors in T2 glottic cancer. *Cancer.* 1980. doi:10.1002/1097-0142(19800301)45:5<991::AID-CNCR2820450526>3.0.CO;2-D
109. McLaughlin MP, Parsons JT, Fein DA, et al. Salvage surgery after radiotherapy failure in T1-T2 squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Head Neck.* 1996. doi:10.1002/(sici)1097-0347(199605/06)18:3<229::aid-hed4>3.0.co;2-1
110. Cohen SM, Garrett CG, Dupont WD, Ossoff RH, Courey MS. Voice-related quality of life in T1 glottic cancer: Irradiation versus endoscopic excision. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2006. doi:10.1177/000348940611500803

111. Bradley PJ, Rinaldo A, Suárez C, et al. Primary treatment of the anterior vocal commissure squamous carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2006. doi:10.1007/s00405-006-0138-3
112. Pearson BW, Salassa JR. Transoral laser microresection for cancer of the larynx involving the anterior commissure. *Laryngoscope*. 2003. doi:10.1097/00005537-200307000-00002
113. Kirchner JA, Carter D. Intralaryngeal barriers to the spread of cancer. *Acta Otolaryngol*. 1987.
114. Rucci L, Gallo O, Fini-Storchi O. Glottic cancer involving anterior commissure: Surgery vs radiotherapy. *Head Neck*. 1991. doi:10.1002/hed.2880130505
115. Zohar Y, Rahima M, Shvili Y, Talmi YP, Lurie H. The controversial treatment of anterior commissure carcinoma of the larynx. *Laryngoscope*. 1992. doi:10.1288/00005537-199201000-00014
116. Laccourreye O, Muscatello L, Laccourreye L, Naudo P, Brasnu D, Weinstein G. Supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidoepiglottopexy for “early” glottic carcinoma classified as T1-T2N0 invading the anterior commissure. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 1997. doi:10.1016/S0196-0709(97)90058-2
117. Bron L, Brossard E, Monnier P, Pasche P. Supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidoepiglottopexy and cricohyoidopexy for glottic and supraglottic carcinomas. *Laryngoscope*. 2000. doi:10.1097/00005537-200004000-00017
118. Krespi YP, Meltzer CJ. Laser surgery for vocal cord carcinoma involving the anterior commissure. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1989. doi:10.1177/000348948909800204
119. Desloge RB, Zeitels SM. Endolaryngeal microsurgery at the anterior glottal commissure: Controversies and observations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000. doi:10.1177/000348940010900409
120. Zeitels SM. Infrapetiole exploration of the supraglottis for exposure of the anterior glottal commissure. *J Voice*. 1998. doi:10.1016/S0892-1997(98)80084-2



121. Olsen KD, Desanto LW, Pearson BW. Positive delphian lymph node: Clinical significance in laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 1987. doi:10.1288/00005537-198709000-00007
122. Foote RL, Buskirk SJ, Stanley RJ, et al. Patterns of failure after total laryngectomy for glottic carcinoma. *Cancer*. 1989. doi:10.1002/1097-0142(19890701)64:1<143::AID-CNCR2820640124>3.0.CO;2-I
123. Kirchner JA, Som ML. Clinical significance of fixed vocal cord. *Laryngoscope*. 1971. doi:10.1288/00005537-197107000-00005
124. Biller HF, Lawson W. PARTIAL LARYNGECTOMY FOR VOCAL CORD CANCER WITH MARKED LIMITATION OR FIXATION OF THE VOCAL CORD. *Laryngoscope*. 1986. doi:10.1288/00005537-198601000-00011
125. Harwood AR, Bryce DP, Rider WD. Management of T3 Glottic Cancer. *Arch Otolaryngol*. 1980. doi:10.1001/archotol.1980.00790350039011
126. Andrade RP, Kowalski LP, Vieira LJ, Santos CR. Survival and functional results of pearson's near-total laryngectomy for larynx and pyriform sinus carcinoma. *Head Neck*. 2000. doi:10.1002/(SICI)1097-0347(200001)22:1<12::AID-HED3>3.0.CO;2-K
127. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006. doi:10.1056/NEJMoa053422
128. Fu KK, Woodhouse RJ, Quivey JM, Phillips TL, Dedo HH. The significance of laryngeal edema following radiotherapy of carcinoma of the vocal cord. *Cancer*. 1982. doi:10.1002/1097-0142(19820215)49:4<655::AID-CNCR2820490409>3.0.CO;2-I
129. Austin JR, Wong FC, Kim EE. Positron emission tomography in the detection of residual laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995. doi:10.1016/S0194-5998(95)70076-5
130. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for Organ Preservation in Advanced Laryngeal Cancer. *N Engl J Med*. 2003. doi:10.1056/NEJMoa031317

131. Biel MA, Maisel RH. Indications for performing hemithyroidectomy for tumors requiring total laryngectomy. *Am J Surg*. 1985. doi:10.1016/0002-9610(85)90149-7
132. Yang CY, Andersen PE, Everts EC, Cohen JJ. Nodal disease in purely glottic carcinoma: Is elective neck treatment worthwhile? *Laryngoscope*. 1998. doi:10.1097/00005537-199807000-00010
133. Hao S, Myers EN, Johnson JT. T3 Glottic Carcinoma Revisited: Transglottic vs Pure Glottic Carcinoma. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 1995. doi:10.1001/archotol.1995.01890020028007
134. Greene RM, Dewitt AI, Otto RA. Management of T3 N0 and T4 N0 glottic carcinomas: Results of a national survey. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2003. doi:10.1067/mhn.2003.65
135. Thomas Robbins K, Clayman G, Levine PA, et al. Neck dissection classification update: Revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2002. doi:10.1001/archotol.128.7.751
136. Ferlito A, Buckley JG, Shaha AR, Rinaldo A. Rationale for selective neck dissection in tumors of the upper aerodigestive tract. *Acta Otolaryngol*. 2001. doi:10.1080/000164801316878809
137. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2004. doi:10.1056/NEJMoa032646
138. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2004. doi:10.1056/NEJMoa032641
139. Kwong DLW, Sham JST, Chua DTT, Choy DTK, Au GKH, Wu PM. The effect of interruptions and prolonged treatment time in radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1997. doi:10.1016/S0360-3016(97)00339-8

140. Fein DA, Lee WR, Hanlon AL, Ridge JA, Curran WJ, Coia LR. Do overall treatment time, field size, and treatment energy influence local control of T1-T2 squamous cell carcinomas of the glottic larynx? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996. doi:10.1016/0360-3016(95)02205-8
141. Allal AS, De Pree C, Dulguerov P, Bieri S, Maire D, Kurtz JM. Avoidance of treatment interruption: An unrecognized benefit of accelerated radiotherapy in oropharyngeal carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999. doi:10.1016/S0360-3016(99)00138-8
142. Suwinski R, Sowa A, Rutkowski T, Wydmanski J, Tarnawski R, Maciejewski B. Time factor in postoperative radiotherapy: A multivariate locoregional control analysis in 868 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003. doi:10.1016/S0360-3016(02)04469-3
143. Sessions DG, Lenox J, Spector GJ. Supraglottic laryngeal cancer: Analysis of treatment results. *Laryngoscope*. 2005. doi:10.1097/01.MLG.0000166896.67924.B7
144. McDonald TJ, DeSanto LW, Weiland LH. Supraglottic larynx and its pathology as studied by whole laryngeal sections. *Laryngoscope*. 1976. doi:10.1288/00005537-197605000-00003
145. Tufano RP. Organ preservation surgery for laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2002. doi:10.1016/S0030-6665(02)00045-2
146. Suarez C, Rodrigo JP, Herranz J, Diaz C, Fernandez JA. Complications of supraglottic laryngectomy for carcinomas of the supraglottis and the base of the tongue. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996. doi:10.1111/j.1365-2273.1996.tb01032.x
147. Bron LP, Soldati D, Monod ML, et al. Horizontal partial laryngectomy for supraglottic squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2005. doi:10.1007/s00405-004-0824-y
148. Desanto LW. Early supraglottic cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990. doi:10.1177/000348949009900801
149. Bocca E. Sixteenth Daniel C. Baker, Jr, memorial lecture: Surgical management of supraglottic cancer and its lymph node metastases in a conservative perspective. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1991. doi:10.1177/000348949110000401

150. Martínez T, Escamilla Y, Gutiérrez M, Bodoque M, Scola B, Vega MF. Conservation surgery for supraglottic carcinoma. Oncological and functional results. *Acta otorrinolaringológica española*. 1996.
151. Robbins KT, Davidson W, Peters LJ, Goepfert H. Conservation Surgery for T2 and T3 Carcinomas of the Supraglottic Larynx. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 1988. doi:10.1001/archotol.1988.01860160065023
152. Herranz-González J, Martínez-Vidal J, Gavtlán J, Gavilán C. Supraglottic laryngectomy: Functional and oncologic results. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996. doi:10.1177/000348949610500104
153. Suárez C, Rodrigo JP, Llorente JL, Herranz J, Martínez JA. Supraglottic laryngectomy with or without postoperative radiotherapy in supraglottic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995. doi:10.1177/000348949510400504
154. Grant DG, Salassa JR, Hinni ML, Pearson BW, Hayden RE, Perry WC. Transoral laser microsurgery for carcinoma of the supraglottic larynx. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2007. doi:10.1016/j.otohns.2006.12.015
155. Steiner W, Ambrosch P. *Endoscopic Laser Surgery of the Upper Aerodigestive Tract*. New York: Thieme; 2000.
156. Peretti G, Piazza C, Cattaneo A, De Benedetto L, Martin E, Nicolai P. Comparison of functional outcomes after endoscopic versus open-neck supraglottic laryngectomies. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006. doi:10.1177/000348940611501106
157. Ambrosch P, Kron M, Steiner W. Carbon dioxide laser microsurgery for early supraglottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998. doi:10.1177/000348949810700810
158. Köllisch M, Werner JA, Lippert BM, Rudert H. Functional results following partial supraglottic resection. Comparison of conventional surgery vs. transoral laser microsurgery. *Adv Otorhinolaryngol*. 1995.
159. Motta G, Esposito E, Motta S, Tartaro G, Testa D. CO2 laser surgery in the treatment of glottic cancer. *Head Neck*. 2005. doi:10.1002/hed.20135

160. Park YM, Kim WS, Byeon HK, Lee SY, Kim SH. Surgical techniques and treatment outcomes of transoral robotic supraglottic partial laryngectomy. *Laryngoscope*. 2013. doi:10.1002/lary.23767
161. Mendelsohn AH, Remacle M, Van Der Vorst S, Bachy V, Lawson G. Outcomes following transoral robotic surgery: Supraglottic laryngectomy. *Laryngoscope*. 2013. doi:10.1002/lary.23621
162. Rudert HH, Werner JA, Höft S. Transoral carbon dioxide laser resection of supraglottic carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999. doi:10.1177/000348949910800901
163. Zeitels SM, Koufman JA, Davis RK, Vaughan CW. Endoscopic Treatment of Supraglottic and Hypopharynx Cancer. *Laryngoscope*. 1994. doi:10.1288/00005537-199401000-00012
164. Davis RK, Kriskovich MD, Buntin CS, Galloway EB, Jepsen MC. Endoscopic supraglottic laryngectomy with postoperative irradiation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2004. doi:10.1177/000348940411300210
165. Agrawal A, Moon J, Davis RK, et al. Transoral carbon dioxide laser supraglottic laryngectomy and irradiation in stage I, II, and III squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx: Report of southwest oncology group phase 2 trial S9709. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2007. doi:10.1001/archotol.133.10.1044
166. Mendenhall WM, Parsons JT, Mancuso AA, Stringer SP, Cassisi NJ. Radiotherapy for squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx: An alternative to surgery. *Head Neck*. 1996. doi:10.1002/(sici)1097-0347(199601/02)18:1<24::aid-hed4>3.0.co;2-0
167. Harwood AR. Cancer of the larynx--the Toronto experience. *J Otolaryngol Suppl*. 1982.
168. Hinerman RW, Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Villaret DB, Robbins KT. Carcinoma of the supraglottic larynx: Treatment results with radiotherapy alone or with planned neck dissection. *Head Neck*. 2002. doi:10.1002/hed.10069
169. DeSanto LW, Olsen KD, Rohe DE, Perry WC, Keith RL. Quality of life after surgical treatment of cancer of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995. doi:10.1177/000348949510401003

170. Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2006. doi:10.1200/JCO.2006.07.4559
171. Farrag TY, Koch WM, Cummings CW, et al. Supracricoid laryngectomy outcomes: The Johns Hopkins experience. *Laryngoscope*. 2007. doi:10.1097/01.mlg.0000247660.47625.02
172. Brasnu DF. Supracricoid partial laryngectomy with cricothyroidopexy in the management of laryngeal carcinoma. *World J Surg*. 2003. doi:10.1007/s00268-003-7116-3
173. Laccourreye O, Hans S, Borzog-Grayeli A, Maulard-Durdux C, Brasnu D, Housset M. Complications of postoperative radiation therapy after partial laryngectomy in supraglottic cancer: A long-term evaluation. *Otolaryngol Neck Surg*. 2000. doi:10.1016/S0194-5998(00)70210-5
174. De Vincentiis M, Minni A, Gallo A, Di Nardo A. Supracricoid partial laryngectomies: Oncologic and functional results. *Head Neck*. 1998. doi:10.1002/(SICI)1097-0347(199809)20:6<504::AID-HED3>3.0.CO;2-T
175. Laccourreye H, Laccourreye O, Weinstein G, Menard M, Brasnu D. Supracricoid laryngectomy with cricothyroidopexy: A partial laryngeal procedure for selected supraglottic and transglottic carcinomas. *Laryngoscope*. 1990. doi:10.1288/00005537-199007000-00009
176. Shah JP. Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract. *Am J Surg*. 1990. doi:10.1016/S0002-9610(05)80554-9
177. Wenig BL, Applebaum EL. The Submandibular Triangle in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx and Hypopharynx. *Laryngoscope*. 1991. doi:10.1288/00005537-199105000-00013
178. Brentani RR, Kowalski LP, Soares JF, et al. End results of a prospective trial on elective lateral neck dissection vs type III modified radical neck dissection in the management of supraglottic and transglottic carcinomas. *Head Neck*. 1999. doi:10.1002/(SICI)1097-0347(199912)21:8<694::AID-HED3>3.0.CO;2-B

179. Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A. Selective neck dissection (IIA, III): A rational replacement for complete functional neck dissection in patients with N0 supraglottic and glottic squamous carcinoma. *Laryngoscope*. 2008. doi:10.1097/MLG.0b013e31815f6f25
180. Yao M, Dornfeld KJ, Buatti JM, et al. Intensity-modulated radiation treatment for head-and-neck squamous cell carcinoma - The University of Iowa experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005. doi:10.1016/j.ijrobp.2005.02.025
181. Stell PM, Tobin KE. The behavior of cancer affecting the subglottic space. *CANADJOTOLARYNGOL*. 1975.
182. Dahm JD, Sessions DG, Paniello RC, Harvey J. Primary subglottic cancer. *Laryngoscope*. 1998. doi:10.1097/00005537-199805000-00022
183. Uhlman D, Adams G, Resnick JM, et al. Cervical lymph node status and survival in laryngeal carcinoma: Prognostic factors. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995. doi:10.1177/000348949510400903
184. Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope*. 2005. doi:10.1097/01.mlg.0000161338.54515.b1
185. STELL PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: tumour factors. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1990. doi:10.1111/j.1365-2273.1990.tb00436.x
186. Hirabayashi H, Uno K, Ohgaki H, et al. Extracapsular spread of squamous cell carcinoma in neck lymph nodes: Prognostic factor of laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 1991. doi:10.1288/00005537-199105000-00010
187. Prim MP, Madero R, De Diego JI, Nistal M, Hardisson D, Gavilán J. Extracapsular spread and desmoplastic pattern in neck lymph nodes: Two prognostic factors of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999. doi:10.1177/000348949910800710

188. Carl J, Andersen LJ, Pedersen M, Greisen O. Prognostic factors of local control after radiotherapy in T1 glottic and supraglottic carcinoma of the larynx. *Radiother Oncol*. 1996. doi:10.1016/0167-8140(96)01738-0
189. Reddy SP, Hong RL, Nagda S, Emami B. Effect of Tumor Bulk on Local Control and Survival of Patients With T1 Glottic Cancer: A 30-Year Experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007. doi:10.1016/j.ijrobp.2007.05.077
190. Iloabachie K, Nathan CAO, Ampil F, Morgan ML, Caldito G. Return of vocal cord movement: An independent predictor of response to nonsurgical management of laryngeal cancers. *Laryngoscope*. 2007. doi:10.1097/MLG.0b013e31812e960d
191. Murakami R, Nishimura R, Baba Y, et al. Prognostic factors of glottic carcinomas treated with radiation therapy: Value of the adjacent sign on radiological examinations in the sixth edition of the UICC TNM staging system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005. doi:10.1016/j.ijrobp.2004.05.024
192. Ljumanovic R, Langendijk JA, Van Watingen M, et al. MR imaging predictors of local control of glottic squamous cell carcinoma treated with radiation alone. *Radiology*. 2007. doi:10.1148/radiol.2441060593
193. Ljumanović R, Langendijk JA, Schenk B, et al. Supraglottic carcinoma treated with curative radiation therapy: Identification of prognostic groups with MR imaging. *Radiology*. 2004. doi:10.1148/radiol.2322031001
194. Castelijns JA, Golding RP, Van Schaik C, Valk J, Snow GB. MR findings of cartilage invasion by laryngeal cancer: Value in predicting outcome of radiation therapy. *Radiology*. 1990. doi:10.1148/radiology.174.3.2305047
195. Castelijns JA, Van Den Brekel MWM, Tobi H, et al. Laryngeal carcinoma after radiation therapy: Correlation of abnormal MR imaging signal patterns in laryngeal cartilage with the risk of recurrence. *Radiology*. 1996. doi:10.1148/radiology.198.1.8539369
196. Murakami R, Baba Y, Furusawa M, et al. Early glottic squamous cell carcinoma: Predictive value of MR imaging for the rate of 5-year local control with radiation therapy. *Acta radiol*. 2000. doi:10.1258/rsmacta.41.1.38



197. Mukherji SK, O'Brien SM, Gerstle RJ, et al. The ability of tumor volume to predict local control in surgically treated squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx. *Head Neck*. 2000. doi:10.1002/(SICI)1097-0347(200005)22:3<282::AID-HED11>3.0.CO;2-K
198. Kraas JR, Underhill TE, D'Agostino RB, Williams DW, Cox JA, Greven KM. Quantitative analysis from CT is prognostic for local control of supraglottic carcinoma. *Head Neck*. 2001. doi:10.1002/hed.10030
199. Schwartz DL, Rajendran J, Yueh B, et al. FDG-PET prediction of head and neck squamous cell cancer outcomes. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2004. doi:10.1001/archotol.130.12.1361
200. Roh JL, Pae KH, Choi SH, et al. 2-[18F]-Fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography as guidance for primary treatment in patients with advanced-stage resectable squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Eur J Surg Oncol*. 2007. doi:10.1016/j.ejso.2007.01.002
201. Piccirillo JF, Lacy PD, Basu A, Spitznagel EL. Development of a new head and neck cancer-specific comorbidity index. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2002. doi:10.1001/archotol.128.10.1172
202. Gallo O, Sarno A, Baroncelli R, Bruschini L, Boddi V. Multivariate analysis of prognostic factors in T3 N0 laryngeal carcinoma treated with total laryngectomy. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2003. doi:10.1016/S0194-5998(03)00228-6
203. Castro MAF, Dedivitis RA, Ribeiro KCB. Comorbidity measurement in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *ORL*. 2007. doi:10.1159/000099223
204. Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoğlu G, Önerci M, Gürsel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol - Head Neck Med Surg*. 1998. doi:10.1016/S0196-0709(98)90100-4
205. Bauer WC, Lesinski SG, Ogura JH. The significance of positive margins in hemilaryngectomy specimens. *Laryngoscope*. 1975. doi:10.1288/00005537-197501000-00001

206. Wenig BL, Berry BW. Management of Patients With Positive Surgical Margins After Vertical Hemilaryngectomy. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* 1995. doi:10.1001/archotol.1995.01890020034008
207. Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Van Blommestein R, Hermans J, Van Krieken HHJM, Cornelisse CJ. DNA ploidy status as a prognostic marker and predictor of lymph node metastasis in laryngeal carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2002. doi:10.1177/000348940211101112
208. WESTERBEEK HA, MOOI WJ, HILGERS FJM, BARIS G, BEGG AC, BALM AJM. Ploidy status and the response of T1 glottic carcinoma to radiotherapy. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1993. doi:10.1111/j.1365-2273.1993.tb00537.x
209. Đanić D, Miličić D, Prgomet D, Leović D. Prognostic factors in carcinoma of the larynx: relevance of DNA ploidy, S-fractions and localization of the tumour. *J Laryngol Otol.* 1999. doi:10.1017/s0022215100144433
210. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, et al. p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1997. doi:10.1200/JCO.1997.15.9.3111
211. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, et al. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope.* 2003. doi:10.1097/00005537-200301000-00031
212. 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. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.031
213. Demiral AN, Sarioglu S, Birlik B, Sen M, Kinay M. Prognostic significance of EGF receptor expression in early glottic cancer. *Auris Nasus Larynx.* 2004. doi:10.1016/j.anl.2004.05.003
214. Parikh RR, Yang Q, Haffty BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in T1-2 NO laryngeal cancer treated with primary radiation therapy. *Cancer.* 2007. doi:10.1002/cncr.22432

215. Pignataro L, Sambataro G, Pagani D, Pruneri G. Clinico-prognostic value of D-type cyclins and p27 in laryngeal cancer patients: a review. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2005.
216. Chen AY, Matson LK, Roberts D, Goepfert H. The significance of comorbidity in advanced laryngeal cancer. *Head Neck.* 2001. doi:10.1002/hed.1079
217. STELL PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: host factors. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1990. doi:10.1111/j.1365-2273.1990.tb00442.x
218. Franchin G, Minatel E, Gobitti C, et al. Radiation treatment of glottic squamous cell carcinoma, stage I and II: Analysis of factors affecting prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998. doi:10.1016/S0360-3016(97)00768-2
219. Johansen L V., Grau C, Overgaard J. Laryngeal Carcinoma: Multivariate Analysis of Prognostic Factors in 1 252 Consecutive Patients Treated with Primary Radiotherapy. *Acta Oncol (Madr).* 2003. doi:10.1080/02841860310017595
220. Lohynska R, Slavicek A, Bahanan A, Novakova P. Predictors of local failure in early laryngeal cancer. *Neoplasma.* 2005.
221. Nguyen-Tan PF, Le QT, Quivey JM, et al. Treatment results and prognostic factors of advanced T3-4 laryngeal carcinoma: The University of California, San Francisco (UCSF) and Stanford University Hospital (SUH) experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001. doi:10.1016/S0360-3016(01)01538-3
222. Ritoe SC, Krabbe PFM, Kaanders JHAM, Van Den Hoogen FJA, Verbeek ALM, Marres HAM. Value of routine follow-up for patients cured of laryngeal carcinoma. *Cancer.* 2004. doi:10.1002/cncr.20536
223. Pfister DG, Spencer S, Brizel DM, et al. Head and neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2014.
224. Liening DA, Duncan NO, Blakeslee DB, Smith DB. Hypothyroidism following radiotherapy for head and neck cancer. In: *Otolaryngology - Head and Neck Surgery.* ; 1990. doi:10.1177/019459989010300102

225. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y
226. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4
227. Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev*. 1991. doi:10.1101/gad.5.10.1813
228. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (80- )*. 2001. doi:10.1126/science.1064921
229. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80- )*. 2001. doi:10.1126/science.1065062
230. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80- )*. 2001. doi:10.1126/science.1065329
231. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*. 2003. doi:10.1016/S0092-8674(03)00231-9
232. Xu P, Vernooij SY, Guo M, Hay BA. The *Drosophila* microRNA *mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol*. 2003. doi:10.1016/S0960-9822(03)00250-1
233. Johnston RJ, Hobert O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2003. doi:10.1038/nature02255
234. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science (80- )*. 2004. doi:10.1126/science.1091903

235. Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2-Like Target Genes. *Plant Cell*. 2003. doi:10.1105/tpc.016238
236. Chen X. A MicroRNA as a Translational Repressor of APETALA2 in Arabidopsis Flower Development. *Science (80- )*. 2004. doi:10.1126/science.1088060
237. Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, et al. Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Curr Biol*. 2003. doi:10.1016/j.cub.2003.09.035
238. Palatnik JF, Allen E, Wu X, et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*. 2003. doi:10.1038/nature01958
239. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000. doi:10.1038/35002607
240. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000. doi:10.1016/S1097-2765(00)80245-2
241. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000. doi:10.1038/35040556
242. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002. doi:10.1016/S0960-9822(02)00809-6
243. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA*. 2003. doi:10.1261/rna.2146903
244. Michael MZ, O'Connor SM, Van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003.
245. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*. 2002. doi:10.1101/gad.974702

246. Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003. doi:10.1016/S0960-9822(03)00287-2
247. Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, et al. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*. 2003. doi:10.1016/S1534-5807(03)00228-4
248. Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*. 2003. doi:10.1261/rna.2141503
249. Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific microRNAs. *Dev Cell*. 2003. doi:10.1016/S1534-5807(03)00227-2
250. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, et al. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. doi:10.1073/pnas.2333854100
251. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, BDLWAYRBB. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*". *Genes Dev*. *Genes Dev*. 2003.
252. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science (80-)*. 2003. doi:10.1126/science.1080372
253. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004. doi:10.1093/nar/gkh023
254. Bashirullah A, Pasquinelli AE, Kiger AA, Perrimon N, Ruvkun G, Thummel CS. Coordinate regulation of small temporal RNAs at the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol*. 2003. doi:10.1016/S0012-1606(03)00063-0
255. Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V. Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and Broad-Complex gene activity. *Dev Biol*. 2003. doi:10.1016/S0012-1606(03)00208-2

256. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. doi:10.1073/pnas.242606799
257. Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of *Drosophila* microRNA genes. *Genome Biol*. 2003.
258. Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*. 2003. doi:10.1261/rna.5980303
259. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002. doi:10.1093/emboj/cdf476
260. Ohler U, Yekta S, Lim LP, Bartel DP, Burge CB. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA*. 2004. doi:10.1261/rna.5206304
261. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003. doi:10.1038/nature01957
262. Zeng Y, Cullen BR. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*. 2003. doi:10.1261/rna.2780503
263. Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonné R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res*. 2003. doi:10.1093/nar/gkg855
264. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003. doi:10.1101/gad.1158803
265. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science (80- )*. 2004. doi:10.1126/science.1090599
266. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001. doi:10.1038/35053110

267. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001. doi:10.1016/S0092-8674(01)00431-7
268. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint É, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (80- )*. 2001. doi:10.1126/science.1062961
269. Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001. doi:10.1101/gad.927801
270. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000.
271. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*. 2001. doi:10.1101/gad.862301
272. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002. doi:10.1093/emboj/cdf582
273. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998. doi:10.1038/35888
274. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (80- )*. 1999. doi:10.1126/science.286.5441.950
275. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000. doi:10.1038/35005107
276. Parrish S, Fleenor J, Xu SQ, Mello C, Fire A. Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell*. 2000. doi:10.1016/S1097-2765(00)00106-4



277. Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* (80- ). 2001. doi:10.1126/science.1062039
278. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*. 2001. doi:10.1093/emboj/20.23.6877
279. Nykänen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 2001. doi:10.1016/S0092-8674(01)00547-5
280. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00908-X
281. Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B, Zamore PD. Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell*. 2002. doi:10.1016/S1097-2765(02)00651-2
282. Vance V, Vaucheret H. RNA silencing in plants - Defense and counterdefense. *Science* (80- ). 2001. doi:10.1126/science.1061334
283. Pickford AS, Catalanotto C, Cogoni C, Macino G. 9 Quelling in *Neurospora crassa*. *Adv Genet*. 2002.
284. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* (80- ). 2001. doi:10.1126/science.1064023
285. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* (80- ). 2002. doi:10.1126/science.1073827
286. Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, et al. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. 1999. doi:10.1016/S0092-8674(00)81644-X
287. Catalanotto C, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. Gene silencing in worms and fungi. *Nature*. 2000. doi:10.1038/35005169

288. Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. doi:10.1073/pnas.200217597
289. Cerutti L, Mian N, Bateman A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci*. 2000. doi:10.1016/S0968-0004(00)01641-8
290. Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*. 2003. doi:10.1038/nature02123
291. Song JJ, Liu J, Tolia NH, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*. 2003. doi:10.1038/nsb1016
292. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*. 2003.
293. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev*. 2002. doi:10.1101/gad.1025202
294. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*. 2003. doi:10.1038/nature01956
295. Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev*. 2002. doi:10.1101/gad.1022002
296. Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science (80- )*. 2003. doi:10.1126/science.1079695
297. Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science (80- )*. 2002. doi:10.1126/science.1076311

298. Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.* 2003. doi:10.1101/gad.1048103
299. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* 2003. doi:10.1101/gad.1064703
300. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003. doi:10.1073/pnas.1630797100
301. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003. doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8
302. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003. doi:10.1016/S0092-8674(03)00759-1
303. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell.* 2002. doi:10.1016/S1097-2765(02)00541-5
304. Kasschau KD, Xie Z, Allen E, et al. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell.* 2003. doi:10.1016/S1534-5807(03)00025-X
305. Olsen P, Feinbaum R, Liu F, Silverman H, Moss E, Ambros V. Developmental regulation and mechanism of action of the lin-4 translational repressor RNA. *Int C elegans Meet.* 1999.
306. Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol.* 2002. doi:10.1006/dbio.2001.0563
307. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell.* 2002.

308. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 2003. doi:10.1038/nbt831
309. Abrahante JE, Daul AL, Li M, et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. *Dev Cell.* 2003. doi:10.1016/S1534-5807(03)00127-8
310. Lin SY, Johnson SM, Abraham M, et al. The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable MicroRNA target. *Dev Cell.* 2003. doi:10.1016/S1534-5807(03)00124-2
311. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell.* 2003. doi:10.1016/S0092-8674(03)01018-3
312. Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM. Identification of *Drosophila* microRNA targets. *PLoS Biol.* 2003. doi:10.1371/journal.pbio.0000060
313. Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: Translational control and development. *Nat Rev Genet.* 2003. doi:10.1038/nrg1125
314. Saxena S, Jónsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2003. doi:10.1074/jbc.M307089200
315. Mette MF, Aufsatz W, Van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 2000. doi:10.1093/emboj/19.19.5194
316. Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 2002. doi:10.1093/emboj/cdf464
317. Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K ichi, Ayoub N, Cohen A, Grewal SIS. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science (80- ).* 2002. doi:10.1126/science.1076466
318. Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science (80- ).* 2002. doi:10.1126/science.1077183

319. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* (80- ). 2002. doi:10.1126/science.1074973
320. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. *Cell*. 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00909-1
321. Lai EC. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*. 2002. doi:10.1038/ng865
322. Pusch O, Boden D, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Nucleotide sequence homology requirements of HIV-1-specific short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res*. 2003. doi:10.1093/nar/gkg876
323. Meneely PM, Herman RK. Lethals, steriles and deficiencies in a region of the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1979.
324. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. 1981. doi:10.1016/0092-8674(81)90501-8
325. Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell*. 1989. doi:10.1016/0092-8674(89)90171-2
326. Weigel D, Ahn JH, Blázquez MA, et al. Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2000.
327. Hipfner DR, Weigmann K, Cohen SM. The bantam gene regulates *Drosophila* growth. *Genetics*. 2002.
328. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003.
329. Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr Biol*. 2003. doi:10.1016/S0960-9822(03)00281-1

330. Kawasaki H, Taira K. Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells. *Nature*. 2003. doi:10.1038/nature01730
331. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0637
332. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, Uberti ECD. miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*. 2005. doi:10.1002/jcp.20282
333. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. 2005. doi:10.1002/path.1825
334. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. doi:10.1073/pnas.0500613102
335. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High Expression of Precursor MicroRNA-155/BIC RNA in Children with Burkitt Lymphoma. *Genes Chromosom Cancer*. 2004. doi:10.1002/gcc.10316
336. Kluiver J, Haralambieva E, De Jong D, et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosom Cancer*. 2006. doi:10.1002/gcc.20273
337. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006. doi:10.1016/j.ccr.2006.01.025
338. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014
339. Lancman JJ, Caruccio NC, Harfe BD, et al. Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development. *Dev Dyn*. 2005. doi:10.1002/dvdy.20591
340. Schulman BRM, Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Reciprocal expression of lin-41 and the microRNAs let-7 and mir-125 during mouse embryogenesis. *Dev Dyn*. 2005. doi:10.1002/dvdy.20599

341. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. doi:10.1073/pnas.0506654102
342. Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: A bird of a different feather. *J Clin Oncol*. 1999. doi:10.1200/jco.1999.17.1.399
343. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005. doi:10.1056/NEJMoa050995
344. Redon R, Hussenet T, Bour G, et al. Amplicon mapping and transcriptional analysis pinpoint Cyclin L as a candidate oncogene in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2002.
345. Zhao X, Weir BA, LaFramboise T, et al. Homozygous deletions and chromosome amplifications in human lung carcinomas revealed by single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4603
346. Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2004. doi:10.1074/jbc.C400438200
347. Martin MM, Lee EJ, Buckenberger JA, Schmittgen TD, Elton TS. MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblast. *J Biol Chem*. 2006. doi:10.1074/jbc.M601496200
348. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. doi:10.1073/pnas.0506216102
349. He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. doi:10.1073/pnas.0509603102
350. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0137
351. Karube Y, Tanaka H, Osada H, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00015.x

352. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. doi:10.1073/pnas.0510565103
353. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. doi:10.1073/pnas.0404432101
354. Iorio M V., Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1783
355. Feng YH, Wu CL, Tsao CJ, et al. Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer: Correlation with the clinical stage of the disease. *Cancer Biol Ther*. 2011. doi:10.4161/cbt.11.1.13965
356. Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, et al. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007. doi:10.1182/blood-2006-12-062398
357. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*. 2010. doi:10.1038/nature09284
358. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Front Immunol*. 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00019
359. Ma X, Conklin DJ, Li F, et al. The oncogenic microRNA miR-21 promotes regulated necrosis in mice. *Nat Commun*. 2015. doi:10.1038/ncomms8151
360. Sekuklu SD, Donoghue MTA, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. In: *Biochemical Society Transactions*. ; 2009. doi:10.1042/BST0370918
361. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*. 2006. doi:10.1200/JCO.2005.05.5194



362. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.04.004
363. Ji R, Cheng Y, Yue J, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 2007. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.141986
364. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell.* 2007. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040
365. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *J Immunol.* 2009. doi:10.4049/jimmunol.0803560
366. Lu TX, Hartner J, Lim E-J, et al. MicroRNA-21 Limits In Vivo Immune Response-Mediated Activation of the IL-12/IFN- $\gamma$  Pathway, Th1 Polarization, and the Severity of Delayed-Type Hypersensitivity. *J Immunol.* 2011. doi:10.4049/jimmunol.1101235
367. Murugaiyan G, Garo LP, Weiner HL. MicroRNA-21, T helper lineage and autoimmunity. *Oncotarget.* 2015. doi:10.18632/oncotarget.3928
368. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene.* 2003. doi:10.1038/sj.onc.1206170
369. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *Gastroenterology.* 2007. doi:10.1053/j.gastro.2007.05.022
370. Feng YH, Tsao CJ. Emerging role of microRNA-21 in cancer (Review). *Biomed Reports.* 2016. doi:10.3892/br.2016.747
371. Hu A, Huang JJ, Xu WH, et al. MiR-21/miR-375 ratio is an independent prognostic factor in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Cancer Res.* 2015.

372. Jin H, Tae HK, Hwang SK, et al. Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol Cancer Ther.* 2006. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0433
373. Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of Human Micro-RNA in Growth and Response to Chemotherapy in Human Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Gastroenterology.* 2006. doi:10.1053/j.gastro.2006.02.057
374. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem.* 2007. doi:10.1074/jbc.M611393200
375. Yamamoto H, Mori M. MicroRNAs as therapeutic targets and colorectal cancer therapeutics. *Adv Exp Med Biol.* 2016. doi:10.1007/978-3-319-42059-2\_13
376. Xie Y, Yao Q, Butt AM, et al. Expression profiling of serum microRNA-101 in HBV-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2014. doi:10.4161/cbt.29688
377. Li X, Shi Y, Yin Z, Xue X, Zhou B. An eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in lung adenocarcinoma. *J Transl Med.* 2014. doi:10.1186/1479-5876-12-159
378. Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer.* 2010. doi:10.1016/j.ejca.2010.05.012
379. Deng G, Teng Y, Huang F, et al. MicroRNA-101 inhibits the migration and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma cells via direct suppression of vascular endothelial growth factor-C. *Mol Med Rep.* 2015. doi:10.3892/mmr.2015.4239
380. Wang Z, He R, Xia H, Wei Y, Wu S. MicroRNA-101 has a suppressive role in osteosarcoma cells through the targeting of c-FOS. *Exp Ther Med.* 2016. doi:10.3892/etm.2016.3085

381. Li S, Fu H, Wang Y, et al. MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009. doi:10.1002/hep.22757
382. Suzuki M, Cao K, Kato S, et al. Targeting ceramide synthase 6-dependent metastasis-prone phenotype in lung cancer cells. *J Clin Invest*. 2016. doi:10.1172/JCI79775
383. Wu B, Lei D, Wang L, et al. MiRNA-101 inhibits oral squamous-cell carcinoma growth and metastasis by targeting zinc finger E-box binding homeobox 1. *Am J Cancer Res*. 2016.
384. Friedman JM, Liang G, Liu CC, et al. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res*. 2009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3114
385. Lin C, Huang F, Shen G, Yiming A. MicroRNA-101 regulates the viability and invasion of cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015.
386. Nakahara O, Takamori H, Iwatsuki M, et al. Carcinogenesis of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas: Loss of microRNA-101 promotes overexpression of histone methyltransferase EZH2. *Ann Surg Oncol*. 2012. doi:10.1245/s10434-011-2068-6
387. Zhang X, Schulz R, Edmunds S, et al. MicroRNA-101 Suppresses Tumor Cell Proliferation by Acting as an Endogenous Proteasome Inhibitor via Targeting the Proteasome Assembly Factor POMP. *Mol Cell*. 2015. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.036
388. Liu X, Tang H, Chen J, et al. MicroRNA-101 inhibits cell progression and increases paclitaxel sensitivity by suppressing MCL-1 expression in human triplenegative breast cancer. *Oncotarget*. 2015. doi:10.18632/oncotarget.4039
389. Zhang K, Zhang Y, Ren K, Zhao G, Yan K, Ma B. MicroRNA-101 inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by downregulation of EZH2 expression. *Oncol Rep*. 2014. doi:10.3892/or.2014.3459

390. Zhang JG, Guo JF, Liu DL, Liu Q, Wang JJ. MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2. *J Thorac Oncol*. 2011. doi:10.1097/JTO.0b013e318208eb35
391. Valera E, Spencer B, Mott J, et al. MicroRNA-101 modulates autophagy and oligodendroglial alpha-synuclein accumulation in multiple system atrophy. *Front Mol Neurosci*. 2017. doi:10.3389/fnmol.2017.00329
392. Wang L, Zhuang L, Rong H, et al. MicroRNA-101 inhibits proliferation of pulmonary microvascular endothelial cells in a rat model of hepatopulmonary syndrome by targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2015. doi:10.3892/mmr.2015.4471
393. Zhao X, Wang K, Hu F, et al. MicroRNA-101 protects cardiac fibroblasts from hypoxia-induced apoptosis via inhibition of the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015. doi:10.1016/j.biocel.2015.06.005
394. Long JM, Lahiri DK. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid- $\beta$  precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.053
395. Huang C, Xiao X, Yang Y, et al. MicroRNA-101 attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and activation. *J Biol Chem*. 2017. doi:10.1074/jbc.M117.805747
396. Liu J, Hua R, Gong Z, et al. Human amniotic epithelial cells inhibit CD4<sup>+</sup> T cell activation in acute kidney injury patients by influencing the miR-101-c-Rel-IL-2 pathway. *Mol Immunol*. 2017. doi:10.1016/j.molimm.2016.11.019
397. Floris I, Descamps B, Vardeu A, et al. Gestational Diabetes Mellitus Impairs Fetal Endothelial Cell Functions Through a Mechanism Involving MicroRNA-101 and Histone Methyltransferase Enhancer of Zester Homolog-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304730

398. Vella S, Pomella S, Leoncini PP, et al. MicroRNA-101 is repressed by EZH2 and its restoration inhibits tumorigenic features in embryonal rhabdomyosarcoma. *Clin Epigenetics*. 2015. doi:10.1186/s13148-015-0107-z
399. Cao R, Wang L, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science (80- )*. 2002. doi:10.1126/science.1076997
400. Akpa MM, Iglesias D, Chu LL, et al. Wilms tumor suppressor, WT1, cooperates with MicroRNA-26a and MicroRNA-101 to suppress translation of the polycomb protein, EZH2, in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*. 2016. doi:10.1074/jbc.M115.678029
401. Lei YM, Zu YF, Wang J, et al. Interleukin-1 $\beta$ -mediated suppression of microRNA-101 and upregulation of enhancer of zeste homolog 2 is involved in particle-induced lung cancer. *Med Oncol*. 2015. doi:10.1007/s12032-014-0387-8
402. Wang L, Zhang LF, Wu J, et al. IL-1 $\beta$ -mediated repression of microRNA-101 Is Crucial for Inflammation-promoted lung Tumorigenesis. *Cancer Res*. 2014. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0960
403. Zhang Y, Guo X, Xiong L, et al. MicroRNA-101 suppresses SOX9-dependent tumorigenicity and promotes favorable prognosis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett*. 2012. doi:10.1016/j.febslet.2012.10.053
404. Sheng Y, Ding S, Chen K, et al. Functional analysis of miR-101-3p and Rap1b involved in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Biochem Cell Biol*. 2014. doi:10.1139/bcb-2013-0128
405. Bos JL. Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. 2005. doi:10.1016/j.ceb.2005.02.009
406. Liu J, Pang Y, Wang H, et al. miR-101 inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells via downregulating the expression of DNA methyltransferase 3a. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2016.
407. Wang L, Yao J, Sun H, et al. MicroRNA-101 suppresses progression of lung cancer through the PTEN/AKT signaling pathway by targeting DNA methyltransferase 3A. *Oncol Lett*. 2017. doi:10.3892/ol.2016.5423

408. Wang R, Wang H Bin, Hao CJ, et al. MiR-101 Is Involved in Human Breast Carcinogenesis by Targeting Stathmin1. *PLoS One*. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0046173
409. LIN X, GUAN H, LI H, et al. miR-101 inhibits cell proliferation by targeting Rac1 in papillary thyroid carcinoma. *Biomed Reports*. 2014. doi:10.3892/br.2013.192
410. Long Y, Wu Z, Yang X, et al. MicroRNA-101 inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells via targeting c-FOS. *Mol Med Rep*. 2016. doi:10.3892/mmr.2016.5534
411. Chakravarthi BVSK, Goswami MT, Pathi SS, et al. MicroRNA-101 regulated transcriptional modulator SUB1 plays a role in prostate cancer. *Oncogene*. 2016. doi:10.1038/onc.2016.164
412. Hao Y, Gu X, Zhao Y, et al. Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway in vivo. *Cancer Prev Res*. 2011. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0333
413. Konno Y, Dong P, Xiong Y, et al. MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget*. 2014. doi:10.18632/oncotarget.2157
414. Wang J, Zeng H, Li H, et al. MicroRNA-101 Inhibits Growth, Proliferation and Migration and Induces Apoptosis of Breast Cancer Cells by Targeting Sex-Determining Region Y-Box 2. *Cell Physiol Biochem*. 2017. doi:10.1159/000481445
415. Wang L, Li L, Guo R, et al. MiR-101 promotes breast cancer cell apoptosis by targeting Janus Kinase 2. *Cell Physiol Biochem*. 2014. doi:10.1159/000363010
416. Guan H, Dai Z, Ma Y, Wang Z, Liu X, Wang X. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by targeting EYA1 in breast cancer. *Int J Mol Med*. 2016. doi:10.3892/ijmm.2016.2557
417. Liu N, Xia WY, Liu SS, et al. MicroRNA-101 targets von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL) to induce HIF1 $\alpha$  mediated apoptosis and cell cycle arrest in normoxia condition. *Sci Rep*. 2016. doi:10.1038/srep20489

418. Yin J, Wang M, Jin C, Qi Q. miR-101 sensitizes A549 NSCLC cell line to CDDP by activating caspase 3-dependent apoptosis. *Oncol Lett.* 2014. doi:10.3892/ol.2013.1725
419. Fan P, Liu L, Yin Y, et al. MicroRNA-101-3p reverses gemcitabine resistance by inhibition of ribonucleotide reductase M1 in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 2016. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.038
420. Li G, Yang F, Gu S, Li Z, Xue M. MicroRNA-101 induces apoptosis in cisplatin-resistant gastric cancer cells by targeting VEGF-C. *Mol Med Rep.* 2016. doi:10.3892/mmr.2015.4560
421. Lin S, Shao N nan, Fan L, Ma X cai, Pu F fei, Shao Z wu. Effect of microRNA-101 on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cells by targeting mTOR. *J Huazhong Univ Sci Technol - Med Sci.* 2014. doi:10.1007/s11596-014-1369-y
422. Zhen YF, Li ST, Zhu YR, Wang XD, Zhou XZ, Zhu LQ. Identification of DNA-PKcs as a primary resistance factor of salinomycin in osteosarcoma cells. *Oncotarget.* 2016. doi:10.18632/oncotarget.12712
423. Liu JJ, Lin XJ, Yang XJ, et al. A novel AP-1/miR-101 regulatory feedback loop and its implication in the migration and invasion of hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 2014. doi:10.1093/nar/gku872
424. Cho HM, Jeon HS, Lee SY, et al. microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med.* 2011. doi:10.3892/etm.2011.284
425. Semaan A, Qazi AM, Seward S, et al. MicroRNA-101 inhibits growth of epithelial ovarian cancer by relieving chromatin-mediated transcriptional repression of p21 waf1/cip1. *Pharm Res.* 2011. doi:10.1007/s11095-011-0547-x
426. Carvalho J, Van Grieken NC, Pereira PM, et al. Lack of microRNA-101 causes E-cadherin functional deregulation through EZH2 up-regulation in intestinal gastric cancer. *J Pathol.* 2012. doi:10.1002/path.4032

427. Cao P, Deng Z, Wan M, et al. MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ . *Mol Cancer*. 2010. doi:10.1186/1476-4598-9-108
428. Jiang R, Zhang C, Liu G, Gu R, Wu H. MicroRNA-101 inhibits proliferation, migration and invasion in osteosarcoma cells by targeting ROCK1. *Am J Cancer Res*. 2017.
429. Li MH, Tian LL, Ren H, et al. MicroRNA-101 is a potential prognostic indicator of laryngeal squamous cell carcinoma and modulates CDK8. *J Transl Med*. 2015. doi:10.1186/s12967-015-0626-6
430. Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2004. doi:10.1016/j.canlet.2003.08.034
431. Zhao S, Zhang Y, Zheng X, et al. Loss of MicroRNA-101 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocytes. *J Cell Physiol*. 2015. doi:10.1002/jcp.24995
432. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007. doi:10.1038/nrc2131
433. Huang F, Lin C, Shi YH, Kuerban G. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation, invasion, and promotes apoptosis by regulating cyclooxygenase-2 in hela cervical carcinoma cells. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2013. doi:10.7314/APJCP.2013.14.10.5915
434. Chandramouli A, Onyeagucha BC, Mercado-Pimentel ME, et al. MicroRNA-101 (miR-101) post-transcriptionally regulates the expression of EP4 receptor in colon cancers. *Cancer Biol Ther*. 2012. doi:10.4161/cbt.13.3.18874
435. Zhao H, Tang H, Huang Q, et al. MiR-101 targets USP22 to inhibit the tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2016.
436. Wang C, Lu S, Jiang J, Jia X, Dong X, Bu P. Hsa-microRNA-101 suppresses migration and invasion by targeting Rac1 in thyroid cancer cells. *Oncol Lett*. 2014. doi:10.3892/ol.2014.2361
437. Hu Z, Lin Y, Chen H, et al. MicroRNA-101 suppresses motility of bladder cancer cells by targeting c-Met. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013. doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.042



438. Hui Y, Li Y, Jing Y, Feng JQ, Ding Y. miRNA-101 acts as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma by targeting CX chemokine receptor 7. *Am J Transl Res*. 2016.
439. Liu N, Zhang L, Wang Z, et al. MicroRNA-101 inhibits proliferation, migration and invasion of human glioblastoma by targeting SOX9. *Oncotarget*. 2017. doi:10.18632/oncotarget.13706
440. Wang L, Zhang X, Jia LT, et al. C-Myc-mediated epigenetic silencing of MicroRNA-101 contributes to dysregulation of multiple pathways in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014. doi:10.1002/hep.26720
441. Strillacci A, Valerii MC, Sansone P, et al. Loss of miR-101 expression promotes Wnt/  $\beta$ -catenin signalling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. *J Pathol*. 2013. doi:10.1002/path.4097
442. Smits M, Nilsson J, Mir SE, et al. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget*. 2010. doi:10.18632/oncotarget.205
443. Tian T, Mingyi M, Qiu X, Qiu Y. MicroRNA-101 reverses temozolomide resistance by inhibition of GSK3 $\beta$  in glioblastoma. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.12861
444. Tang XR, Wen X, He QM, et al. MicroRNA-101 inhibits invasion and angiogenesis through targeting ITGA3 and its systemic delivery inhibits lung metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*. 2017. doi:10.1038/cddis.2016.486
445. Slattery ML, Herrick JS, Pellatt DF, et al. Site-specific associations between miRNA expression and survival in colorectal cancer cases. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.11173
446. Lv X, Li J, Yang B. Clinical effects of MIR-101 on prognosis of hepatocellular carcinoma and carcinogenic mechanism of anti-MIR-101. *Oncol Rep*. 2016. doi:10.3892/or.2016.4980
447. Li JT, Jia LT, Liu NN, et al. MiRNA-101 inhibits breast cancer growth and metastasis by targeting CX chemokine receptor 7. *Oncotarget*. 2015. doi:10.18632/oncotarget.5067

448. Xiaoping L, Zhibin Y, Wenjuan L, et al. CPEB1, a histone-modified hypomethylated gene, is regulated by miR-101 and involved in cell senescence in glioma. *Cell Death Dis.* 2013. doi:10.1038/cddis.2013.197
449. Luo L, Zhang T, Liu H, et al. MiR-101 and Mcl-1 in non-small-cell lung cancer: Expression profile and clinical significance. *Med Oncol.* 2012. doi:10.1007/s12032-011-0085-8
450. Mirisola V, Mora R, Esposito AI, et al. A prognostic multigene classifier for squamous cell carcinomas of the larynx. *Cancer Lett.* 2011. doi:10.1016/j.canlet.2011.03.013
451. Tian L, Li M, Ge J, et al. MiR-203 is downregulated in laryngeal squamous cell carcinoma and can suppress proliferation and induce apoptosis of tumours. *Tumor Biol.* 2014. doi:10.1007/s13277-014-1790-7
452. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating micrnas as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg.* 2010. doi:10.1097/SLA.0b013e3181cc939f
453. Chen ZH, Zhang GL, Li HR, et al. A panel of five circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate.* 2012. doi:10.1002/pros.22495
454. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010. doi:10.1002/ijc.25007
455. Tian L, Zhang J, Ge J, et al. MicroRNA-205 suppresses proliferation and promotes apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Med Oncol.* 2014. doi:10.1007/s12032-013-0785-3
456. Zhang T, Han G, Wang Y, Chen K, Sun Y. MicroRNA expression profiles in supraglottic carcinoma. *Oncol Rep.* 2014. doi:10.3892/or.2014.3117
457. Ren J, Zhu D, Liu M, Sun Y, Tian L. Downregulation of miR-21 modulates Ras expression to promote apoptosis and suppress invasion of Laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2010. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.047

458. Li MH, Tian LL, Wang L, et al. Down-Regulation of miR-129-5p Inhibits Growth and Induces Apoptosis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma by Targeting APC. *PLoS One*. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0077829
459. Li D, Feng J, Wu T, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2013. doi:10.1016/j.ajpath.2012.08.042
460. Bian K, Fan J, Zhang X, et al. MicroRNA-203 leads to G1 phase cell cycle arrest in laryngeal carcinoma cells by directly targeting survivin. *FEBS Lett*. 2012. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.050
461. Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Aii S, Imoto I, Inazawa J. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009. doi:10.1093/carcin/bgp250
462. Yuan Y, Zeng ZY, Liu XH, et al. MicroRNA-203 inhibits cell proliferation by repressing  $\Delta$ Np63 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2011. doi:10.1186/1471-2407-11-57
463. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Gómez de Cedrón M, et al. Genetic and Epigenetic Silencing of MicroRNA-203 Enhances ABL1 and BCR-ABL1 Oncogene Expression. *Cancer Cell*. 2008. doi:10.1016/j.ccr.2008.04.018
464. Li J, Chen Y, Zhao J, Kong F, Zhang Y. MiR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. *Cancer Lett*. 2011. doi:10.1016/j.canlet.2011.02.003
465. Bo J, Yang G, Huo K, et al. MicroRNA-203 suppresses bladder cancer development by repressing bcl-w expression. *FEBS J*. 2011. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07997.x
466. Chiang Y, Song Y, Wang Z, et al. Aberrant Expression of miR-203 and Its Clinical Significance in Gastric and Colorectal Cancers. *J Gastrointest Surg*. 2011. doi:10.1007/s11605-010-1367-8

467. Saini S, Arora S, Majid S, et al. Curcumin modulates microRNA-203-mediated regulation of the Src-Akt axis in bladder cancer. *Cancer Prev Res*. 2011. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0267
468. Saini S, Majid S, Yamamura S, et al. Regulatory role of mir-203 in prostate cancer progression and metastasis. *Clin Cancer Res*. 2011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2619
469. Ayaz L, Görür A, Yaroğlu HY, Özcan C, Tamer L. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with laryngeal squamous cell carcinoma: Potential early-detection markers for laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013. doi:10.1007/s00432-013-1469-2
470. Cao P, Zhou L, Zhang J, et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013. doi:10.1002/hed.23011
471. Hui ABY, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2010. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2166
472. Doebele C, Bonauer A, Fischer A, et al. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*. 2010. doi:10.1182/blood-2010-01-264812
473. Chang SS, Wei WJ, Smith I, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2008. doi:10.1002/ijc.23831
474. Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, et al. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck*. 2009. doi:10.1002/hed.21017
475. Cai KM, Bao XL, Kong XH, et al. Hsa-miR-34c suppresses growth and invasion of human laryngeal carcinoma cells via targeting c-Met. *Int J Mol Med*. 2010. doi:10.3892/ijmm-00000378
476. Liu M, Wu H, Liu T, et al. Regulation of the cell cycle gene, BTG2, by miR-21 in human laryngeal carcinoma. *Cell Res*. 2009. doi:10.1038/cr.2009.72

477. Long XB, Sun G Bin, Hu S, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. *Oncol Rep.* 2009. doi:10.3892/or\_00000554
478. Wu H, Liu T, Wang R, et al. MicroRNA-16 targets zyxin and promotes cell motility in human laryngeal carcinoma cell line HEp-2. *IUBMB Life.* 2011. doi:10.1002/iub.417
479. Lui VWY, Hedberg ML, Li H, et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov.* 2013. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0103
480. Cizkova M, Vacher S, Meseure D, et al. PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer.* 2013. doi:10.1186/1471-2407-13-545
481. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012. doi:10.1038/nrm3470
482. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2011. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0568
483. Cybula M, Wieteska L, Józefowicz-Korczyńska M, Karbownik MS, Grzelczyk WL, Szemraj J. New miRNA expression abnormalities in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomarkers.* 2016. doi:10.3233/CBM-160598
484. Gupta S, Iljin K, Sara H, et al. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0244
485. Tickenbrock L, Hehn S, Sargin B, et al. Activation of Wnt signalling in acute myeloid leukemia by induction of Frizzled-4. *Int J Oncol.* 2008. doi:10.3892/ijo\_00000111
486. Díaz Prado SM, Medina Villaamil V, Aparicio Gallego G, et al. Expression of Wnt gene family and frizzled receptors in head and neck squamous cell carcinomas. *Virchows Arch.* 2009. doi:10.1007/s00428-009-0793-z

487. Galera-Ruiz H, Ríos-Moreno MJ, González-Cámpora R, et al. The cadherin-catenin complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2012. doi:10.1007/s00405-011-1892-4
488. Psyrris A, Kotoula V, Fountzilias E, et al. Prognostic significance of the Wnt pathway in squamous cell laryngeal cancer. *Oral Oncol*. 2014. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.01.005
489. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007. doi:10.1038/sj.onc.1210083
490. Liu J, Lei DP, Jin T, Zhao XN, Li G, Pan XL. Altered expression of mir-21 and PTEN in human laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2011.
491. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 2008. doi:10.1038/cr.2008.24
492. Hu A, Huang JJ, Xu WH, et al. MiR-21 and miR-375 microRNAs as candidate diagnostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the larynx: Association with patient survival. *Am J Transl Res*. 2014.
493. Zhou P, Zeng F, Liu J, Lv D, Liu S. Correlation between miR-21 expression and laryngeal carcinoma risks: A meta-analysis. *J Evid Based Med*. 2016. doi:10.1111/jebm.12184
494. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, et al. miR-221&222 Regulate TRAIL Resistance and Enhance Tumorigenicity through PTEN and TIMP3 Downregulation. *Cancer Cell*. 2009. doi:10.1016/j.ccr.2009.10.014
495. Li R, Wang R, Zhai R, Dong Z. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway inhibits proliferation and induces apoptosis of laryngeal carcinoma cells in vitro. *Tumori*. 2011. doi:10.1700/1018.11096
496. Paez J, Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res*. 2003.

497. Yu C, Liu Y, Tan H, et al. Metadherin regulates metastasis of squamous cell carcinoma of the head and neck via AKT signalling pathway-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* 2014. doi:10.1016/j.canlet.2013.09.033
498. Abraham AG, O'Neill E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer. In: *Biochemical Society Transactions.* ; 2014. doi:10.1042/BST20140070
499. Zhu W, Zhao Y, Xu Y, et al. Dissection of Protein Interactomics Highlights MicroRNA Synergy. *PLoS One.* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0063342
500. Banerjee R, Mani RS, Russo N, et al. The tumor suppressor gene rap1GAP is silenced by miR-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. *Oncogene.* 2011. doi:10.1038/onc.2011.141
501. Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, et al. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Exp Cell Res.* 2009. doi:10.1016/j.yexcr.2008.12.010
502. Varambally S, Cao Q, Mani RS, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science (80- ).* 2008. doi:10.1126/science.1165395
503. Thu KL, Chari R, Lockwood WW, Lam S, Lam WL. MiR-101 DNA copy loss is a prominent subtype specific event in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011. doi:10.1097/JTO.0b013e3182217d81
504. Luo C, Merz PR, Chen Y, et al. MiR-101 inhibits melanoma cell invasion and proliferation by targeting MITF and EZH2. *Cancer Lett.* 2013. doi:10.1016/j.canlet.2013.08.021
505. Kim S, Xu X, Hecht A, Boyer TG. Mediator is a transducer of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Biol Chem.* 2006. doi:10.1074/jbc.M602696200
506. Conaway RC, Sato S, Tomomori-Sato C, Yao T, Conaway JW. The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 2005. doi:10.1016/j.tibs.2005.03.002

507. Firestein R, Bass AJ, Kim SY, et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates  $\beta$ -catenin activity. *Nature*. 2008. doi:10.1038/nature07179
508. Morris EJ, Ji JY, Yang F, et al. E2F1 represses  $\beta$ -catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8. *Nature*. 2008. doi:10.1038/nature07310
509. He SB, Yuan Y, Wang L, Yu MJ, Zhu YB, Zhu XG. Effects of cyclin-dependent kinase 8 specific siRNA on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011. doi:10.1186/1756-9966-30-109
510. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035
511. Wong N, Wang X. miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*. 2015. doi:10.1093/nar/gku1104
512. Donner AJ, Szostek S, Hoover JM, Espinosa JM. CDK8 Is a Stimulus-Specific Positive Coregulator of p53 Target Genes. *Mol Cell*. 2007. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.026
513. Donner AJ, Hoover JM, Szostek SA, Espinosa JM. Stimulus-specific transcriptional regulation within the p53 network. *Cell Cycle*. 2007. doi:10.4161/cc.6.21.4893
514. Donner AJ, Ebmeier CC, Taatjes DJ, Espinosa JM. CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network. *Nat Struct Mol Biol*. 2010. doi:10.1038/nsmb.1752
515. Belakavadi M, Fondell JD. Cyclin-Dependent Kinase 8 Positively Cooperates with Mediator To Promote Thyroid Hormone Receptor-Dependent Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol*. 2010. doi:10.1128/mcb.01541-09
516. Schiano C, Casamassimi A, Rienzo M, de Nigris F, Sommese L, Napoli C. Involvement of Mediator complex in malignancy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014. doi:10.1016/j.bbcan.2013.12.001
517. Grünberg S, Hahn S. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*. 2013. doi:10.1016/j.tibs.2013.09.002



518. Boube M, Joulia L, Cribbs DL, Bourbon HM. Evidence for a Mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man. *Cell*. 2002. doi:10.1016/S0092-8674(02)00830-9
519. Napoli C, Sessa M, Infante T, Casamassimi A. Unraveling framework of the ancestral Mediator complex in human diseases. *Biochimie*. 2012. doi:10.1016/j.biochi.2011.09.016
520. Firestein R, Hahn WC. Revving the throttle on an oncogene: CDK8 takes the driver seat. *Cancer Res*. 2009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1704
521. Paoletti AC, Parmely TJ, Tomomori-Sato C, et al. Quantitative proteomic analysis of distinct mammalian Mediator complexes using normalized spectral abundance factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006. doi:10.1073/pnas.0606379103
522. Zhao J, Ramos R, Demma M. CDK8 regulates E2F1 transcriptional activity through S375 phosphorylation. *Oncogene*. 2013. doi:10.1038/onc.2012.364
523. Firestein R, Shima K, Nosho K, et al. CDK8 expression in 470 colorectal cancers in relation to  $\beta$ -catenin activation, other molecular alterations and patient survival. *Int J Cancer*. 2010. doi:10.1002/ijc.24908
524. Kaur M, Velmurugan B, Tyagi A, Agarwal C, Singh RP, Agarwal R. Silibinin suppresses growth of human colorectal carcinoma SW480 cells in culture and xenograft through down-regulation of  $\beta$ -catenin-dependent signaling. *Neoplasia*. 2010. doi:10.1593/neo.10188
525. Roychowdhury S, Iyer MK, Robinson DR, et al. Personalized oncology through integrative high-throughput sequencing: A pilot study. *Sci Transl Med*. 2011. doi:10.1126/scitranslmed.3003161
526. Kapoor A, Goldberg MS, Cumberland LK, et al. The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*. 2010. doi:10.1038/nature09590

527. Kishi T, Ikeda A, Koyama N, Fukada J, Nagao R. A refined two-hybrid system reveals that SCFCdc4-dependent degradation of Swi5 contributes to the regulatory mechanism of S-phase entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. doi:10.1073/pnas.0806253105
528. Chi Y, Huddleston MJ, Zhang X, et al. Negative regulation of Gcn4 and Msn2 transcription factors by Srb10 cyclin-dependent kinase. *Genes Dev*. 2001. doi:10.1101/gad.867501
529. Young RA. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*. 2011. doi:10.1016/j.cell.2011.01.032
530. Doncic A, Falleur-Fettig M, Skotheim JM. Distinct Interactions Select and Maintain a Specific Cell Fate. *Mol Cell*. 2011. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.025
531. Knuesel MT, Meyer KD, Donner AJ, Espinosa JM, Taatjes DJ. The Human CDK8 Subcomplex Is a Histone Kinase That Requires Med12 for Activity and Can Function Independently of Mediator. *Mol Cell Biol*. 2009. doi:10.1128/mcb.00993-08
532. Meyer KD, Donner AJ, Knuesel MT, York AG, Espinosa JM, Taatjes DJ. Cooperative activity of cdk8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3. *EMBO J*. 2008. doi:10.1038/emboj.2008.78
533. Mulholland DJ, Dedhar S, Coetzee GA, Nelson CC. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev*. 2005. doi:10.1210/er.2003-0034
534. Katoh M, Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2316
535. Kielman MF, Rindapää M, Gaspar C, et al. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of  $\beta$ -catenin signaling. *Nat Genet*. 2002. doi:10.1038/ng1045
536. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011. doi:10.1038/nrc3090

537. EA C, YJ K. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up. *Otolaryngol Clin North Am.* 2008.
538. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011. doi:10.3322/caac.20121
539. Yu X, Wu Y, Liu Y, et al. miR-21, miR-106b and miR-375 as Novel Potential Biomarkers for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014. doi:10.2174/1389201015666140519110616
540. Russ R, Slack FJ. Cigarette-smoke-induced dysregulation of MicroRNA expression and its role in lung carcinogenesis. *Pulm Med.* 2012. doi:10.1155/2012/791234
541. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2000.
542. Re M, Magliulo G, Gioacchini FM, et al. Expression Levels and Clinical Significance of miR-21-5p, miR-let-7a, and miR-34c-5p in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int.* 2017. doi:10.1155/2017/3921258
543. Arantes LMRB, Laus AC, Melendez ME, et al. MiR-21 as prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma patients undergoing an organ preservation protocol. *Oncotarget.* 2017. doi:10.18632/oncotarget.14253
544. Erkul E, Yilmaz I, Gungor A, Kurt O, Babayigit MA. MicroRNA-21 in laryngeal squamous cell carcinoma: Diagnostic and prognostic features. *Laryngoscope.* 2017. doi:10.1002/lary.26226