



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TÜKÜRÜK BEZİ TÜMÖRLERİNDE MikroRNA
EKSPRESYONU**

**DR. ÖVGÜ ÇİNPOLAT
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR. MURAT ÜNAL**

MERSİN- 2015



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**TÜKÜRÜK BEZİ TÜMÖRLERİNDE MikroRNA
EKSPRESYONU**

**DR. ÖVGÜ ÇİNPOLAT
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF.DR. MURAT ÜNAL**

MERSİN- 2015

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca cerrahi ve teorik bilgilerimin geliŐmesinde bŸyŸk katkılarından ve tezimin hazırlanmasında gŸsterdiđi emekten dolayı tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Murat Ÿnal'a, asistanlık dŸnemim boyunca beraber çalıŐtıđım her zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarıma, bana unutulmaz dostluklar kazandıran çok değerli asistan arkadaşlarıma, kliniğimizin tŸm çalıŐanlarına ve bana her zaman destek olmuŐ olan sevgili aileme; bana kattıkları mesleki, sosyal ve duygusal değerler için tŸm kalbimle teŐekkŸr ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ ve AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	8
Tükürük bezleri embriyolojisi	8
Tükürük bezleri anatomisi	9
Tükürük bezi tümörleri	10
Benign tükürük bezi tümörleri	17
Malign tükürük bezi tümörleri	20
MikroRNA	23
MikroRNA'ların fonksiyonu	27
MikroRNA'ların klinik önemi ve hastalıklarla ilişkisi	28
GEREÇ VE YÖNTEM	30
BULGULAR	39
TARTIŞMA	53
SONUÇ VE ÖNERİLER	58
KAYNAKLAR	59
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	70
TABLolar DİZİNİ	71
ŞEKİLLER DİZİNİ	72

ÖZET

Tükürük bezi tümörleri nadir rastlanan tümörlerdir. Genellikle tükürük bezinin içinde ya da komşuluğunda asemptomatik kitleler şeklinde belirir. Parotisin tümörleri tüm tükürük bezi tümörlerinin %70-80 kadarıdır ve yaklaşık %80 benignedir. Diğer yandan submandibuler, sublingual ve minör tükürük bezlerinde malignite oranı daha yüksektir. Tükürük bezi tümörlerinin tanısında radyoloji ve ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAS) yaygın kullanılan yöntemlerdir. MikroRNA (miRNA)'lar hücre differensiyonu, çoğalması, gelişimi, ve apoptosiz regülasyonunda rol alan küçük, kodlanmayan RNA'lardır. MiRNA ekspresyonlarının artışı veya azalışının bazı kanser türleri ve bunların prognozu ile ilgili belirteç olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Bu nedenle biz de miRNA'nın tükürük bezi tümörlerinde tanısal ve prognostik amaçlı değerini araştırmayı amaçladık.

Şubat 2013- Ekim 2014 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı polikliniğine başvuran ve tükürük bezi tümörü tespit edilen 20 hasta çalışmaya dahil edildi. Tükürük bezi tümörü tanısı olmayan 17 birey ise kontrol grubunu oluşturuldu. Toplam 95 adet miRNA'nın doku, kan ve tükürükteki ekspresyonu incelendi. Plazmada bakılan mikroRNA'lardan 8 tanesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azaldığı saptandı ($p < 0.05$). Hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde ise ekspresyonları istatistiksel olarak azalan veya artan miRNA saptanmadı. Doku örneklerindeki miRNA'ların hasta kan ve tükürük örneklerindeki miRNA'lar ile aralarındaki korelasyon değerlendirildi. Çalışmadaki ortalama korelasyon katsayıları bize yalnızca doku ile tükürük örnekleri arasında zayıf bir korelasyon olduğunu gösterdi.

Elde ettiğimiz sonuçlar, hastalığın patofizyolojisinde bu moleküllerin etkin olabileceğini gösterebilir. Aynı zamanda daha fazla hastanın katılımıyla yapılacak çok merkezli çalışmaların bu moleküller ile hastalık arasındaki ilişkiyi daha anlaşılır ve net bir şekilde ortaya koyabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler : Erken tanı, mikroRNA, parotis bezi, tükürük bezi tümörleri

ABSTRACT

MicroRNA Expression in Salivary Gland Tumors

Salivary gland tumors are rare tumors. They usually appear as an asymptomatic mass in the salivary glands or in the neighborhood. Parotid tumors are 70-80% of all salivary gland tumors and are about 80% benign. On the other hand submandibular, sublingual and minor salivary gland malignancy rate is higher. In the diagnosis of salivary gland tumors radiology and fine needle biopsy (FNA) are commonly used methods. MicroRNA (miRNA)'s are small, non-coding RNAs involved in the cell differentiation, proliferation, growth, and apoptosis. There are some studies showing that miRNA expressions increase or decrease in some cancer types and may be markers associated with prognosis. For this reason, we aimed to investigate diagnostic and prognostic value of miRNA in salivary gland tumors.

In the period of February 2013– October 2013, 20 patients with salivary gland tumor referred to Mersin University Department of Otolaryngology were included into the study. The control group consist of 17 people that don't have any salivary gland tumor. Totally 95 subtypes of miRNA's expression examined in tissue, blood and saliva samples. In peripheral blood samples taken from patients 8 of expressed microRNA have been found to be significant decreased compared with the control group ($p < 0.05$). In the saliva samples taken from patients statistically significant ascending or descending subtype was not determined. MiRNAs in patient tissue samples were evaluated for their correlation with miRNAs in blood and saliva samples. The average correlation coefficient in this study showed us only a weak correlation between saliva and tissue samples.

Our results may show effectiveness of these molecules about the disease pathophysiology. We also think that a multicenter study with the participation of more patient will help us to reveal relationship between these molecules and the disease more clear and understandable.

Keywords: Early diagnose, microRNA, parotid gland, salivary gland tumors

GİRİŞ ve AMAÇ

Tükürük bezi tümörleri nadir rastlanan tümörler olup değişik histopatolojik tipler içermektedir. Tüm baş boyun bölgesindeki tümörlerin yaklaşık %3-12' sini, insan vücudundaki tüm tümörlerin ise %2'sinden azını oluşturmaktadır. Tükürük bezi tümörlerinin çoğu, tükürük bezinin içinde ya da komşuluğunda asemptomatik kitleler şeklinde belirir. Parotisin tümörleri tüm tükürük bezi tümörlerinin %70-80 kadardır ve yaklaşık %80 benigndir. Diğer yandan submandibuler, sublingual ve minör tükürük bezlerinde malignite oranı daha yüksektir. Tükürük bezinde en sık görülen benign tümör pleomorfik adenom, en sık görülen malign tümörler ise mukoepidermoid karsinom ve adenoid kistik karsinomdur. Tükürük bezi tümörlerinin %95'i erişkinlerde ortaya çıkar. Çocuklardaki en sık mezenkimal tümör hemanjiyom, en sık epitelyal tümör ise pleomorfik adenomdur. Çocuklarda bulunan tükürük bezi malignitelerinin yaklaşık %85'i parotis bezinden kaynaklanmaktadır. Bu yaş grubunda en sık görülen malign tümör tipi mukoepidermoid karsinomdur

Parotis tümörlerinin yaklaşık %80'i benigndir. Benign tümörler içinde en sık görüleni pleomorfik adenomdur (parotis tümörlerinin %60'ı). Bunu Warthin tümörü takip etmektedir (parotis tümörlerinin %10'u). Malign tümörler nispeten nadir görülür (vakaların %20'si) . En yaygın görülen tükürük bezi malignitesi çoğunlukla parotis bezini tutan mukoepidermoid karsinomdur.

Parotis tümörü tanısında ince iğne aspirasyon sitolojisi (İİAS) etkin ve güvenilir bir yöntemdir. Konvansiyonal manyetik rezonans görüntüleme (MRG); tümör yayılımının, tümör ile fasiyal sinir arasındaki ilişkinin ve tümörlerin iç yapısının saptanmasında değerlidir. Difüzyon ağırlıklı MRG (DA-MRG) da tükürük bezlerinin değişik histolojik alt tiplerinin noninvaziv tanısında seçenek olarak görülmektedir.

Parotis tümörleri multifaktöryel nedenlerle gelişmektedir. Epidemiyolojik çalışmalarla radyasyona maruziyet sonrası tükürük bezi tümör gelişimi bildirilmiştir; ancak edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromu (AIDS), virüs

aracılı malignite, ultraviyole ışık (UVB), hatta sigara ve alkol kullanımı ile tükürük bezi tümör gelişimi arasında ilişki gösterilememiştir^{1,2}

Tükürük bezi tümörlerinin çoğunda cerrahi tedavi uygulanır. İyi huylu tümörlerde cerrahi dışında ek tedaviye gerek yoktur. Kötü huylu tümörlerde ise cerrahi sonrasında radyoterapi veya kemoterapiden de yararlanılabilir

MikroRNA 'lar hücre differensiyonu, çoğalması, gelişimi ve apoptosis regülasyonunda rol alan küçük kodlanmayan RNA'lardır . MiRNA'ların ekspresyonlarının artışı ve azalışının bazı kanser türleri ve bunların prognozu ile ilgili belirteç olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Burada hangi miRNA tipinin hangi kanserle ilişkili olduğu ve prognostik faktör olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceği konusunda yapılan çalışmalara biz de tükürük bezi tümörlerini eklemeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Tükürük bezleri embriyolojisi:

Tükürük bezlerinin kökenini oluşturan germ hücreleri ile ilgili çeşitli görüşler ileri sürülmüştür. Parotis bezinin ektodermal, sublingual ve submandibular bezlerin ektodermal ve endodermal orjinli oldukları bildirilmiştir. Her iki gland için ortak görüş daha çok ektodermal orjinli oldukları yönündedir. Ağız boşluğunu döşeyen epitelin proliferasyonu ile oluşan solid hücre kümeleri mezoderm içine doğru yönelerek bez taslağını oluştururlar. Majör ve minör tükürük bezleri esas olarak benzer şekilde gelişme gösterirler. Primordial parotis, submandibular ve sublingual bezler gelişimin 6-8. haftalarında oluşur. Önce parotis, sonra submandibular daha sonra sublingual glandlar, 10. haftada ise minör tükürük bezleri gelişir.³ Tükürük bezlerinin tam olgunlaşması doğumdan sonra da devam eder.⁴ Parotis beziyle yakın komşuluktaki servikal lenf nodları eş zamanlı olarak mezodermden gelişir.⁵ Parotis bezinin geç enkapsüle olması intraparotid lenf nodlarını ve lenf nodları içerisinde epitelial tükürük bezlerinin sık olmasını açıklar.⁵

Tükürük bezleri anatomisi:

Tükürük bezleri majör ve minör tükürük bezleri olmak üzere iki gruba ayrılır. Majör tükürük bezleri parotis, submandibular ve sublingual bezlerdir. Tükürük bezlerinin en büyüğü olan parotis bezi, ortalama olarak 14-28 gr'dır. Bu bez yüzün yan tarafında, dış kulak yolunun kısmen önünde ve kısmen de aşağısında yer alır. Parotis bezi, derin boyun fasyası ile süreklilik arz eden fibröz bir kapsül (parotis fasyası) ile sarılmıştır.^{6,7} Bez yüzeysel ve derin olmak üzere iki bölümden oluşur. Bezin ana parçası ramus mandibula ile processus mastoideus arasında sıkışmıştır. Bu bölge parotis bezi dışında, n. facialis ve dalları, duyuşal ve otonomik sinirler, eksternal karotis arter ve dalları, retromandibuler (posterior fasyal) ven ve parotis lenf nodlarını içerir. Parotis bezinin esas kanalı (Stensen) oral kavite içerisinde 2. maksiller molar dişin karşısına açılır.⁷ Submandibular bez yaklaşık 7-8 gr ağırlığında, mandibula angulusu ön ve altında, trigonum submandibularede yerleşmiştir. Submandibular glandlar Warthon kanalı ile dil kökündeki karunkula

sublingualise açılır.⁶ Sublingual bez, ağız tabanında frenulum linguae'nın iki yanında yer alır, yaklaşık 3 gr ağırlığındadır. Belirgin bir kapsülü yoktur. Boşaltıcı kanalı 8-20 duktustan oluşur. En kalın duktusuna sublingualis majör (Bartholin kanalı), diğer kanallara sublingualis minör (Rivinus kanalı) denir. Bartholin kanalı submandibular duktus ile karunkula sublingualise, diğer kanallar doğrudan plika sublingualise açılır.⁷ Minör tükürük bezleri labial, bukkal, palatin ve lingual olmak üzere başlıca dört grup halindedir. Kendi küçük duktusları ile doğrudan ağız boşluğuna açılırlar ve bu nedenle merokrin bezler grubuna dahil edilirler. Oral kavitede tonsil üst kutbunda (Weber glandı), tonsil plikalarında ve yaygın olarak yanak, dudak, damak ve dilde, farengeal, molar veya retromolar (Carmalt glandları) bölgelerde yer alırlar.⁴

Tükürük bezlerinin histolojisi:

Hem majör hem de minör tükürük bezleri, asiner ve duktal sistemlere sahiptir. Asinüsler, devamlılığında ara (interkalar) duktuslar ve bunun da devamlılığında çizgili duktuslar ile intralobüler üniteyi oluşturmaktadır. Daha sonra ise interlobüler duktuslar ve ekskretuar duktuslar ile tükürük bezi salgısı oral mukozaya ulaşmaktadır. Morfolojik olarak majör tükürük bezleri seröz, müköz ve serömüköz olmak üzere üç tip sekretuar ünite içermektedir. Seröz olanlar amilaz, müköz olanlar sialomüsin içerir.

Tükürük Bezi Tümörleri

Genel Özellikler

Tükürük bezinde farklı tümör tipleri görülebilmekte, hatta bazen belli bir tümör kitlesi içinde çarpıcı morfolojik değişiklikler izlenebilmektedir. Bazı benign tümörlerin dedifferansiyasyonu ve maligniteye dönüşme yatkınlığı, bazı tümörlerin ise rölatif olarak nadirliğinden dolayı histopatolojik teşhis oldukça zorlaşmaktadır.⁸ Tükürük bezlerinin önemli bir kısmı bifazik (epiteliyal ve myoepiteliyal) hücre komponenti içerir. Myoepitel hücre komponentinin bulunması morfolojiyi çeşitlendirici ve tanıyı güçleştirici bir özelliktir.

Myoepiteliyal farklılaşma var ise matriks üretimi vardır. Bu tip tümörler daha az vaskülarite gösterirler, sınırlı invaziv gelişim yaparlar ve genellikle düşük dereceli tümörlerdir. Myoepitelial hücreler pleomorfik adenoma, myoepitelyoma ve adenoid kistik karsinoma gibi tümörlerde ana komponenti oluştururlar. Onkositik farklılaşan benign tümörler, mukoepidermoid karsinom, asinik hücreli karsinom ve duktus hücreli karsinom gibi tümörlerde myoepitelial farklılaşma görülmez. Benign tükürük bezi tümörleri sınırlı veya kapsüllüdür. Minör glandlarda görülen benign tükürük bezi tümörleri ve pleomorfik adenomlarda sınırlılık tam olmayabilir. Malign tükürük bezi tümörlerinde invazyon paternleri tümörün natürü açısından önemli ipuçları verir. Nodüler yapılar halinde invazyonun, invazyon olarak değerlendirilmesi güç olabilir, ancak bu patern düşük dereceli tümörler ve myoepiteliyal farklılaşmalı tümörlerde görülür, düzensiz infiltratif gelişim ise yüksek dereceli tümörlerde rastlanır. Tükürük bezi tümörlerinin mukoza ve epitel ile ilişkisi, tümörün natürünü belirlemede önemlidir. Mukoza ve deride ülserasyon oluşturan ve epiteli invaze edenlerin büyük kısmı maligndir.⁹ Perinöral invazyon tükürük bezi tümörlerinde özellikle adenoid kistik karsinomda ve polimorfik düşük dereceli adenokarsinomda sık görülür. Mukoepidermoid karsinomda görülmesi tümörün yüksek dereceli olduğunu gösterir. Hiçbir benign tümörde perinöral invazyon görülmediğinden malignite için tanısız bir bulgudur. Ayrıca perinöral invazyon lokal nüks riskinin bir göstergesidir.⁸⁻⁹ Majör tükürük bezi tümörleri tüm baş boyun tümörlerinin %3-4'ünü oluşturur ve hastaların ortalama yaşları malign tümörler için 55, benign tümörler için 40' dır. Parotiste görülen tümörlerin yaklaşık %25'i maligndir.¹⁰ Tükürük bezi tümörleri parotiste submandibuler bezden 12 kez daha sık olup çoğu benigndir ve büyük oranda benign mikst tümördür.^{8,11} Minör tükürük bezi tümörlerinde malignite olasılığı majörlere göre daha yüksektir. Malignite insidansının en fazla olduğu bez sublingual bezdir.¹¹ Parotisin en sık görülen malign tümörü mukoepidermoid karsinomdur, bunu sırasıyla andifferansiye ve asinik hücreli karsinom takip eder. Adenoid kistik karsinom, çoğunlukla submandibuler ve damağın malign tükürük bezi tümörüdür.¹² Çoğu tükürük bezi tümörü unilaterale ve tektir, fakat Warthin tümörü sıklıkla bilateral ve multipl olabilir, ancak bu özellik benign mikst tümör ve asinik hücreli karsinomda da

görülebilmektedir.¹³ Minör tükürük bezi tümörleri sert ve yumuşak damak, yanak, gingiva, dil, tonsilleri içeren oral kavite içerisinde herhangi bir yerde bulunabilir ve sıklığı bu sahalardaki normal glandüler dokunun miktarı ile orantılıdır ve bu da sert damakta daha sık bulunmalarını izah eder. Çeşitli tipte tükürük bezi tümörleri majör tükürük bezi etrafında ya da içerisindeki lenf nodlarında ve ektoptik tükürük bezinde de tanımlanmıştır. Warthin tümörü en sık görülen tiptir, fakat sebasesöz lenfadenoma, benign mikst tümör, bazal hücreli adenom, asinik hücreli karsinom ve mukoepidermoid karsinom da tanımlanmıştır.^{14,15}

Tükürük bezi tümörlerinin etiyolojisi:

Tükürük bezi tümörlerinin etiyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir ve olası bazı etkenler suçlanmıştır. Bunlar, enfeksiyonlar, obstrüktif veya travmatik nedenler, genetik faktörler, virüsler (EBV), iyonize radyasyon maruziyeti, mesleki maruziyet (lastik, metal endüstrisi, nikel maruziyeti, saç-güzellik işinde olanlar, vs.), yaşam stili, beslenme (A avitaminozu), hormonlar (östrojen) olup nadir görülen lenfoepitelyoma benzeri karsinom hariç, yüksek riskli gruplar tanımlanamamıştır.¹⁶ Çocukluk çağındaki radyoterapiyi takiben pleomorfik adenomun ve diğer tümörlerin insidansının arttığını gösteren çalışmalar vardır.^{17,18} Çocuklarda en sık görülen parotis tümörü pleomorfik adenomdur fakat çocuklarda malignite oranı daha yüksektir, yine özellikle atom bombasına maruz kalanlar arasında mukoepidermoid karsinom sıklığında artış bildirilmiştir. Tümör supresör genlerinin mutasyonları karsinom gelişiminde önemli rol oynar. Bunlar arasında p53 geni, normal dokuda hücrelerin büyümesini düzenlemektedir. Bu genin tümör suprese edici fonksiyonunun mutasyon sonucu ortadan kalkması karsinom oluşması için gerekli ortamı sağlar. Benign tümörlerde p53 geni ekspresyonu bulunamamıştır. Malign mikst tümörlerde p53 geni ekspresyonu görülür. Aynı şekilde adenoid kistik kanserlerin etyopatogenezinde de p53 tümör supresyon geni mutasyonu etken olabilir.⁹

Tükürük bezi neoplazmalarının histogenezi ile ilgili görüşler:

Tükürük bezlerinden gelişen tümörlerin histogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda ileri sürülen hipotezler ışık ve elektron mikroskopisi ile yapılan incelemelere dayanır.¹⁹ Karsinom hücreleri fonksiyonel ve morfolojik yönden çoğunlukla geliştikleri hücrelere benzerler. Tümörlerin gelişiminde genel olarak, iki hipotez vardır: Birinci hipoteze göre neoplazmlar tükürük bezinin matür diferansiye kısımlarından, ikinci hipoteze göre ise iyi diferansiye ekskretuar duktus ve interkalar duktustaki rezerv hücrelerden gelişirler.^{19,3} Pleomorfik adenomda, elektron mikroskopik incelemelerde, epitelyal ve miyoepitelyal olmak üzere iki tip hücre olduğu saptanmıştır. Ayrıca mezenkimal hücreler yer alır. Myoepitelial hücreler, mezenkimal metaplazi ile mikst tümör formasyonunda önemli rol oynarlar. Epitelyal ve mezenkimal elemanların karışık olması nedeniyle bu lezyonların histogenezi üzerinde çelişkiler vardır. Hem neoplastik epitelyal ve mezenkimal hücrelerden hem de konnektif dokunun non-neoplastik metaplazisi sonucu epitelyal hücrelerden oluştuğu ileri sürülmüştür.^{11,20} Adenoid kistik karsinomlar interkalar duktusun rezerv hücrelerinin neoplastik değişiklikleri ile hem duktal hem de miyoepitelyal hücrelerden gelişirler.^{19,21} Tükürük bezinin bütün hücreleri teorik olarak keratinize ve skuamöz potansiyel taşırlar. Ekskretuar duktuslardaki metaplazik değişiklikler sonucu, skuamöz hücreli kanser veya mukoepidermoid kanser gelişebilir. Düşük dereceli mukoepidermoid karsinom müköz hücrelerin diferansiyasyonu, yüksek derecede mukoepidermoid kanserlerin ise, skuamöz hücrelerin müköz hücrelere dönüşmesiyle oluştuğu ileri sürülmüştür.⁹ Onkositler, hiperplastik ve pleomorfik mitokondriler içeren hücrelerdir. Bu hücreler yaşın ilerlemesiyle ortaya çıkarlar. Onkositomerler, genellikle yaşlılarda görülür. Asinik hücreli kanserler, asinik, seröz asiner hücrelerde ve interkalar duktus hücrelerinde görülen sekretuar granüller içerir. İnterkalar duktusun rezerv hücreleri bu neoplazmların hipotetik olarak kaynağıdır. İnterkalar duktusun rezerv hücrelerinden gelişen adenokanser hücreleri indiferansiye interkalar duktus hücrelerine çok benzerler.^{19,3,7,11,20}

Tükürük Bezi Tümörlerinin Sınıflandırılması

Tükürük bezi tümörlerinin sınıflandırılması oldukça zor bir alandır. Bunun nedenlerinden biri tümörlerin çoğunun benzer hücre kökenlerinden kaynaklanmasıdır. WHO sınıflandırması daha çok benign ve malign tümörler arasındaki ayrımı vurgularken Ackerman baskın hücre tipine ya da diferansiyasyona dayalı bir grupta önermiştir.^{9,22,23}

Tükürük Bezi Tümörlerinde Dünya Sağlık Örgütü (2005) Histolojik Sınıflaması:

A-Malign Epitelyal Tümörler:

- 1- Asinik hücreli karsinom
- 2- Mukoepidermoid karsinom
- 3- Adenoid kistik karsinom
- 4- Düşük dereceli polimorfik adenokarsinom
- 5- Epitelyal-myoepitelyal karsinom
- 6- Şeffaf hücreli adenokarsinom (başka şekilde sınıflandırılmamış)
- 7- Bazal hücreli karsinom
- 8- Sebace karsinom
- 9- Sebace lenfadenokarsinom
- 10- Kistadenokarsinom
- 11-Düşük dereceli kribriform kistadenokarsinom
- 12- Musinöz adenokarsinom
- 13- Onkositik karsinom
- 14- Tükürük kanalları karsinomu
- 15- Adenokarsinom (başka şekilde sınıflandırılmamış)
- 16- Myoepitelyal karsinom
- 17-Pleomorfik adenom içinde gelişen karsinom (Karsinoma ex pleomorfik adenoma)
- 18- Karsinosarkom
- 19- Metastaz yapan pleomorfik adenom
- 20- Skuamöz hücreli karsinom

- 21- Küçük hücreli karsinom
- 22- Büyük hücreli karsinom
- 23- Lenfoepitelyal karsinom
- 24- Sialoblastom

B-Benign epitelyal tümörler:

- 1- Pleomorfik adenom
- 2- Myoepitelyom
- 3- Bazal hücreli adenom
- 4- Warthin tümörü
- 5- Onkositom
- 6- Kanalikuler adenom
- 7- Sebace adenom
- 8- Lenfadenom
 - a-Sebase
 - b-Non-sebase
- 9- Duktal papillomlar
 - a- İverted duktal papillom
 - b -İntraduktal papillom
 - c- Sialadenoma papilliferum
- 10- Kistadenom

C-Yumuşak doku tümörleri:

- Hemanjioma

D-Hematolenfoid tümörler:

- a-- Hodgkin lenfoma
- b- Diffüz B hücreli lenfoma
- c- Ekstranodal marjinal bölge B hücreli lenfoma

E-Sekonder tümörler

TNM Sınıflaması (AJCC [American Joint Committee on Cancer] -UICC [International Union Against Cancer], 2010):

T--- Primer tümör

Tx Primer tümör değerlendirilememiştir.

T0 Primer tümör ait bulgu yoktur.

T1 Tümörün en büyük çapı 2 cm'den küçük ve ekstraparankimal yayılım yok*

T2 Tümörün en büyük çapı 2 cm'den büyük, 4 cm'den küçük ve ekstraparankimal yayılım yok*

T3 Tümörün en büyük çapı 4 cm'den büyük ve/veya ekstraparenkimal yayılım var*

T4a Deri, mandibula, dış-orta kulak yolu ve/veya fasiyal sinir invazyonu

T4b Kafa kaidesi ve/veya pterigoid plate invazyonu ve/veya karotid arterin tutulumu

* Ekstraparenkimal yayılım, T4a ve 4b' de listelenenler dışında, yumuşak doku veya sinirlerin klinik ya da makroskobik invazyonudur. Mikroskobik invazyon tek başına yeterli değildir.

N---Bölgesel lenf nodları

NX Lenf nodu metastazı değerlendirilememiştir.

N0 Lenf nodu metastazı yoktur.

N1 Tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz ve bu lenf nodunun en büyük çapı 3cm'den küçük

N2a Tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz ve bu lenf nodunun en büyük çapı 3cm'den büyük 6 cm'den küçük

N2b Multipl ipsilateral lenf nodunda metastaz ve bu lenf nodlarının herbirinin en büyük çapı 6 cm'den küçük

N2c Bilateral ya da kontralateral lenf nodlarında metastaz ve bu lenf nodlarının herbirinin en büyük çapı 6 cm'den küçük

N3 En büyük çapı 6 cm'den büyük herhangi bir lenf nodunda metastaz

M---Uzak metastaz

MX Uzak metastaz değerlendirilememiştir.

M0 Uzak metastaz yoktur.

M1 Uzak metastaz vardır.

EVRE GRUPLARI (AJCC [American Joint Committee on Cancer: Manual for Staging of Cancer] - UICC [International Union Against Cancer] 2010):

Evre I T1 N0 M0

Evre II T2 N0 M0

Evre III T3 N0 M0

T1 N1 M0

T2 N1 M0

T3 N1 M0

Evre IVA T4a N0 M0

T4a N1 M0

T1 N2 M0

T2 N2 M0

T3 N2 M0

T4a N2 M0

Evre IVB T4b Herhangi N M0

Herhangi T N3 M0

Evre IVC Herhangi T Herhangi N M1

Malign Tükürük Bezi Tümörlerinde Prognostik Faktörler:

Malign tükürük bezi tümörlerinde prognoza etkili birçok faktör mevcut olup, klinik evre, lokalizasyon ve mikroskopik tip esas olarak en iyi belirleyicilerdir.²⁴

a) Histopatolojik tanı: Tümörlerin tiplerine göre yüksek ya da düşük dereceli olarak iki grupta incelenmesi tedavi protokolünü belirlemede kolaylık sağlar. Rekürrens ve metastaz oranları yüksek dereceli tümörlerde daha yüksek olduğundan multimodüler tedavi gerektirirler.^{25,26}

b) Lenf nodu metastazı: Boyunda klinik olarak pozitif bir lenf nodunun varlığı boyun disseksiyonu endikasyonudur ve prognozu belirgin olarak kötüleştirir.²⁷

c) Ağrı: Malign tümörlerde kötü prognoz göstergesidir.²⁷

- d) Fasiyal paralizi varlığı:** Malignite göstergesidir. Fasiyal paralizi ve hızlı büyüyen tümörlerde prognoz iyi değildir. En sık görüldüğü lezyonlar adenoid kistik karsinom ve indifferansiye karsinomdur.²⁷
- e) Deri tutulumu:** İleri evre ile ilişkili olduğu için kötü prognostik faktördür.²⁷
- f) Evre:** En önemli prognostik parametredir.^{28,29}
- g) Yerleşim yeri:** Submandibuler bezin malign tümörleri daha yüksek rekürrens insidansına sahiptir.^{30,31}
- h) Rekürrens:** Kötü prognoz göstergesidir.²⁷
- i) Uzak metastaz:** Kötü prognoz göstergesidir. En yüksek oranda adenoid kistik karsinomda görülür.²⁷
- j) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA):** Hücre çekirdeğinde DNA'nın replikasyonunu sağlayan DNA polimerazın yardımcı proteinlerinden biridir. Tümör çoğalma hızı PCNA ekspresyonu ile ilişkilidir. PCNA ekspresyonu yüksekse, prognoz kötüdür.^{19,21}
- k) Malignitelere P53 pozitifliği genel olarak prognozun kötü olabileceğini belirtir.**^{19,21}
- l) Hematojen yayılımlarda prognoz kötüdür.**^{19,21}

Benign Tükürük Bezi Tümörleri

1. Pleomorfik adenom:

En sık görülen tükürük bezi tümörüdür. Bütün tümörlerin %60'ını oluşturur ve %80'i parotis yerleşimlidir. Bazen tükürük bezlerinin yanı sıra nazal kavite, üst solunum yolu ve gastrointestinal sistemde de karşılaşılabılır.⁸ Tümör 30-50 yaşlar arasında ve kadınlarda sıktır.³² Bilateral senkron pleomorfik adenom nadirdir.³³ Histolojik olarak tümör tipik olarak miksoid stroma içerisinde epitelial ve myoepitelial hücre tabakalarından oluşan glandüler yapılardan meydana gelir. Benign bir tümör olmasına rağmen beklenmedik bir şekilde uzak metastaz yapabildiği bildirilmiştir.^{34,35} Pleomorfik adenomun histolojik karışık özelliği sitolojisinde de görülür. Karışıklık bir komponentin baskın olması veya atipik sitomorfolojik özelliklerin varlığı nedeniyle meydana gelir. Miksoid komponent fazla ise az sayıdaki epitelial komponenti baskılayabilir ve lezyon hatalı olarak

retansiyon kisti, nodüler fasiitis, schwannom ya da intravenöz pyonejik granülom olarak değerlendirilebilir.^{36,37} Bazal membran globülleri pleomorfik adenom, bazal hücre adenom ve adenoid kistik karsinomda görülebilir.³⁸ Pleomorfik adenomlarda müsin üretimi bir başka güçlüktür ve Warthin tümörü ile düşük dereceli mukoepidermoid karsinom arasında ayırıcı tanı yapmayı gerektirir. Pleomorfik adenomlarda fokal skuamöz metaplazi görülebilir. Skuamöz hücreler kronik sialadenit, lenfoepitelial kist, Warthin tümörü gibi neoplastik ve non-neoplastik lezyonlarda da meydana gelebilir.³⁹

2. Myoepitelyoma (Myoepiteliyal adenom):

Yaklaşık olarak %40'ı parotiste meydana gelir, bunu damak ve minör tükürük bezleri takip eder. Yoğun olarak myoepitelial farklılaşma gösteren benign bir tümör olarak tanımlanır. Hücreler iğsi, plasmositoid, epiteloïd ya da berrak olarak görülebilir, stroma kollogenez ya da mukoid olabilir.⁴⁰ Çoğu myoepitelyomalar tek bir hücre tipinden ya da hücre tiplerinin kombinasyonundan oluşabilir. Myoepitelyomalar İİAS'de nadiren doğru olarak tanınabilir. Genellikle baskın olan hücre tipine bağlı olarak sellüler pleomorfik adenom ya da benign iğsi hücre tümörleri olarak tanımlanabilir.

3. Bazal hücre adenomu:

Tükürük bezinin nadir benign tümörlerindendir ve en sık parotiste daha az sıklıkla submandibular, üst dudak, oral kavite, sert damağın minör tükürük bezlerinde görülür. Solid, trabeküler ve membranöz olarak çeşitli histolojik büyüme paternleri gösterir ve bu çeşitlilik İİAS materyellerinde de görülür. Sitolojik olarak sıklıkla periferik palizatlanma gösteren bazaloïd hücreler, küçük globüller ya da parmak benzeri fragmanlar halinde hyalin stroma görülür. Tanısal olarak adenoid kistik karsinom ile karışma olasılığı fazladır.⁹

4. Warthin Tümörü:

Dünya Sağlık Örgütü adenolenfoma, kist adenolenfoma, papiller kist adenoma lenfomatosis yerine, lenfoïd malignensi ve lenfadenomalar ile karıştırılmasından kaçınmak için bu terimi kullanmayı önermektedir. Genellikle

parotis ve periparotid lenf nodları içinde meydana gelir, diğer yerlerde nadirdir.⁴⁰ Tümör erkeklerde kadınlardan daha sıktır, orta ve yaşlı bireylerde görülür ve sigara içimi ile birlikte. Yavaş büyür, bilateral, unilateral veya multisentrik olabilir. Histolojik olarak Warthin tümörü sıklıkla kistik, lenfoid stromalı, papiller yapılardan meydana gelir. Epitel çift tabakalı ve esas olarak onkositiktir fakat müköz, goblet ya da skuamöz metaplazi alanları içerebilir. Onkositik hücreler özellikle travmaya hassastır, bu nedenle Warthin tümörleri spontan ya da İİAS'ni takiben total ya da subtotal infarkt ve metaplazik değişiklikler gösterebilir.^{41,42} İnce iğne aspirasyon sitolojisi Warthin tümörü tanısında özellikle değerli bir yöntemdir. Karakteristik olarak onkositik epitelial hücre tabakaları, lenfositler, mast hücreleri ve proteinöz yapıda bir zeminden oluşur.⁴³ Onkositik hücreler yoğun tek tabakalı, balpeteği görünümünde olup sıklıkla mast hücreleri ile birlikte Warthin tümörü erişkinlerde kistik parotis bezi lezyonları ile (mukus retansiyon kisti, brankial kleft kisti, kronik sialadenit, kistadenom, düşük gradeli mukoepidermoid karsinom gibi) karışabilir.^{44,45} Periparotid lenf nodları içerisinde Warthin tümörü görülmesi metastaz olarak yorumlanabilir. Onkositik hücreler tabakalar halinde ise onkositoma olarak değerlendirilebilir. Warthin tümöründe skuamöz metaplazi ve kistik değişiklikler seyrek değildir. Bu özellikler hatalı olarak mukoepidermoid karsinom ya da metastatik skuamöz hücreli karsinom olarak değerlendirilebilir.^{46,47} Tükürük bezi tümörlerinin İİAS'nde ekstra ve intrasellüler müsin varlığı mukoepidermoid karsinomların ayırıcı tanısında güvenli bir kriter değildir.⁴⁸ Mukoepidermoid karsinomda meydana gelen epitelial hücre tiplerinin karışımı görülmez, ancak skuamöz metaplazili bir Warthin tümörünü mukoepidermoid karsinomdan ayırmak güçtür. Multipl servikal kitlelerin ayırımında ekstraparotid yerleşimli Warthin tümörü dikkate alınmalıdır.^{49,50}

5. Onkositoma (Onkositik Adenoma):

Oksifilik hücrelerden oluşan nadir, benign bir tümördür. Genellikle unisentriktir, nadiren kistik ve belirgin lenfositik hücre popülasyonu içermez. Sitolojik olarak onkositik epitelial hücreler ve Warthin tümöründen farklı olarak papiller fragmanlar daha sıklıkla görülür. Bir miktar epitelial atipi onkositik baskın benign

lezyonlarda da görülür. Skuamöz metaplazi, atipi ve nekroz ile beraber olduğunda tanı zorlaşır.⁵¹ Metastatik renal, tiroid ve apokrin meme karsinomu özellikle papiller kistik onkositomanın ayırıcı tanısında akılda tutulmalıdır. İİAS'ni takiben onkositoma histolojik olarak asinik hücre karsinomunu taklit eden psödomalign değişiklikler gösterir.⁵²

6. Sebasöz Adenom:

Sebasöz diferansiyasyon normal tükürük bezi parankiminde, pleomorfik adenom, Warthin tümörü, myoepitelyoma ve mukoepidermoid karsinomda da görülür.⁵⁰ Sebasöz hücreler olarak tanımlanan yoğun berrak ve yuvarlak izomorfik nükleuslu, mikrovakuollü sitoplazmaya sahip benign hücrelerden oluşan tümörlerdir.

7. İntraduktal papillom:

Minör tükürük bezlerinde sıklıkla karşılaşılan nadir benign tümördür. Kistik duktal epitelden gelişen soliter neoplazmlardır ve ağrısız şişlikler oluşturur, sert kitleler olarak görülür ve sitolojik olarak adneksial bir tümörü akla getirir. Sitolojik olarak bir miktar papiller dizilim ve üç boyutlu epitelial kümeler, histiyositler, çoğunluğu onkositik diferansiyasyon gösteren hücrelerden oluşur.

Malign Tükürük Bezi Tümörleri

1. Asinik hücreli karsinom:

Tüm tükürük bezi tümörlerinin yaklaşık %6,5'ünü oluşturur. Bunların %80'i parotiste, %17'si intraoral, %4'ü submandibular bezlerde görülür. Tüm yaş gruplarında ve sıklıkla 2. ve 7. dekadlar arasında görülür.²¹ Histolojik olarak değişik paternlerde (solid, lobüler, mikrokistik, foliküler, papiller, kistik) olabilir ve farklı hücresel yapılar (asiner, duktal, vakuollü, berrak, nonspesifik ve glandüler) içerebilir. Yaymanın zemini debri ya da ekstrasellüler müssinden yoksundur. Sayısız çıplak nükleuslar bulunur. Neoplastik hücreler normal asiner hücre gruplarındaki yuvarlak ve iyi sınırlanmanın olmadığı değişen boyutlarda gevşek tabakalar halinde izlenir ve genel olarak hücresel uniforme vardır.

2. Asinik hücre karsinomunun papiller kistik varyantı:

Bu varyant histolojik olarak kolaylıkla teşhis edilir ancak sitolojik tanısı sıklıkla doğru konulmayabilir. Aspiratlara tek sıralı tabakalar ya da kistik zeminde asiner retansiyon kisti, Wartin tümörü, mukoepidermoid karsinom tanısı konulabilir. Epitelial hücrelerin uniform oluşu yararlı bir özelliktir fakat her vakada tanı belirgin olmayabilir.⁵³

3. Mukoepidermoid karsinom:

Çocukluk ve erişkinlerdeki en sık tükürük bezi malignitesidir ve tüm tükürük bezi tümörlerinin %10-15'ini oluşturur. Yaklaşık yarısı majör tükürük bezlerinde meydana gelir (parotiste %45).⁴⁰ Histolojik olarak yapısal ve hücrenel heterojenite vardır. Değişen oranlarda kistik ve solid alanlar, birbiri ile karışan müköz, skuamöz hücreler ve baskın olarak berrak ve onkositik hücrelerden meydana gelir.

4. Adenoid kistik karsinom:

Tüm epitelial tükürük bezi tümörlerinin yaklaşık %10'unu, minör tükürük bezi epitelial tümörlerinin %30'unu oluşturur.⁴⁰ Tüm yaş gruplarında meydana gelmekle birlikte orta yaş ve yaşlılarda daha siktir. Histolojik olarak tümörlerde üç yapısal özellik; kribriiform, tübüler, solid ve iki hücre tipi görülür.

5. Polimorfik düşük dereceli adenokarsinom:

Ağız içi malign tükürük bezi tümörlerinin ikinci sıklıkta olanıdır. Tüm karsinomların %26'sını oluşturur. Yaklaşık %6'sı damaktadır ve hastaların %70'i 50-70 yaş arasındadır.⁴⁰ Histolojik olarak tümör tabakalar, kordonlar, tübüller, kribriiform ve papiller yapılanmalar gösterir.

6. Tükürük bezi duktus karsinomu:

Yüksek dereceli agresif bir karsinomdur. Tükürük bezi malign tümörlerinin %9'unu oluşturur. Çoğu 50 yaştan sonra ortaya çıkar. En sık yerleşim yeri parotistir.⁴⁰ Histolojik olarak yüksek dereceli intraduktal ve invaziv meme

karsinomasına benzer. Kribriform proliferasyon gösteren hücrelerle genişlemiş duktus benzeri yapılar ve infiltratif bir komponentle beraber santral nekroz mevcuttur.

7. Karsinoma ex pleomorfik adenom :

Uzun süreli pleomorfik adenom içerisinde meydana gelen malign bir transformasyonu tanımlar. Seyrek ve tüm tükürük bezi tümörlerinin %3,6'sını, tüm tükürük bezi malignensilerinin %12'sini oluşturur. Genelde 6 ya da 7. dekatlarda ortaya çıkar. Bu tanıyı vermek için rezidü benign pleomorfik adenoma belirlenmelidir. Benign ve malign elemanlar bir arada bulunur. Benign elemanlar genellikle fibriler, metakromatik stromada bulunur. Malign epitelial hücreler gevşek tabakalar, adenoid ya da papilloid kümeler halinde izlenir.⁵⁴

8. Epitelial Myoepitelial Karsinom:

Tükürük bezi tümörlerinin %1'ini oluşturur, %60'ı parotiste meydana gelir ve 6 ve 7. dekalarda sıklığı artar. Histolojik olarak lobüle kontürlü tümör, dış tarafında tek ya da multipl poligonal hücre tabakaları ile çevrelenen, iç sıra tabakası tek sıra kuboidal hücrelerden oluşan iki tabakalı kanal benzeri yapılar oluşturur. Dış tabakalardaki hücreler sitoplazmik berraklık gösterir ve myoepitelial belirteçler ile pozitifdir.

9. Lenfoid neoplazmlar:

Majör tükürük bezi malignensilerinin %1,7-7,7'sini oluşturur.⁵⁵ Tükürük bezinde meydana gelen Non-Hodgkin lenfomaların çoğu B hücrelidir. Ekstranodal marjinal zon B hücre lenfoması primer tükürük bezi lenfomalarının en sık görülen tipidir. Diffüz büyük B hücre lenfomaları tükürük bezi NHL' nın %15'ini oluşturur. Düşük dereceli formlarının otoimmün lenfoepitelial sialadenitlerden ayırımı güçken yüksek dereceli lenfomaların tanısı daha kolaydır.

MikroRNA (miRNA)

MikroRNA'lar, protein kodlamayan, tek sarmallı yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda olan RNA'lardır. RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilen öncü miRNA'lar önce kısa miRNA-miRNA duplekslerine, sonunda da tek sarmallı olgun miRNA ya dönüştürülürler. Olgun miRNA'lar tam ya da tama yakın olan mRNA sıralarına bağlanıp hedefindeki genlerin ekspresyonunu transkripsiyon sonrasında ya translasyonu inhibe ederek ya da RNA degradasyonunu tetikleyerek inhibe eder.⁵⁶ MiRNA'ların hedef mRNA'lara bağlanarak insan genlerinin %30-%90'ının ekspresyonlarını düzenlediği tahmin edilmektedir.⁵⁷ Lee ve arkadaşları, 1993 yılında bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın gen içeriğini incelediklerinde, protein kodlamayan lin-4 olarak isimlendirdikleri genin, 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini bildirmişlerdir. O sıralar bir nematodun yapısal özelliği sanılan ve yaşam döngüsünün zamanlaması ile ilerlemesini kontrol ettiği düşünülen lin-4 keşfedilen ilk miRNA'dır.⁵⁸ Reinhart ve arkadaşları, 2000 yılında *C. elegans*'da, let-7 olarak isim verdikleri 22 nükleotid uzunluğunda, canlıda gelişim basamaklarını düzenleyen farklı bir miRNA daha keşfetmişlerdir. Son yıllarda bitki, virüs ve hayvan hücrelerinde miRNA'lar keşfedilerek toplam 25141 olgun miRNA dan 2154'ünün insanlara ait olduğu belirlenmiştir.⁵⁹⁻⁶¹ MiRNA'ların ekspresyonlarındaki bozukluğun bazı insan kanser türlerinin genetik patogenezinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir.⁶² Tümörlerde miRNA ekspresyonunun bozukluğu hakkında yaygın veriler bulunmaktadır.⁶³ Bu bozukluklar; miRNA genlerinde, RISC (RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi) grubu proteinler ve miRNA yolağındaki proteinlerden sorumlu genlerde oluşan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.⁶⁴ İnsan miRNA'larının kanser ile ilişkisi, genomdaki pozisyonları haritalanarak gösterilmiştir.⁶⁵ Tespit edilen miRNA'ların kromozom yerleşimleri, bazı kanser türlerinin gelişiminden sorumlu genetik değişikliklerle örtüşmektedir. MiRNA'ların çoğunlukla, heterozigotluğun kaybolduğu bölgeler olan kırılma bölgelerine yerleşik olduğu gösterilmiştir. Bu kırılma bölgeler amplifikasyonun çok az görüldüğü yerlerde veya kromozomal kırılma noktasının olduğu yerlerde gözlenmiştir.⁶⁶ MiRNA'ların anormal ekspresyonu multifaktöryel bozukluklarda ve bazı insan kanser türlerinin genetik

patogenezinde kritik bir rol oynadığı yapılan çalışmalarla tesbit edilmiştir.⁶² Gen ekspresyonunun miRNA'lar aracılığıyla transkripsiyon sonrasında düzenlenmesinin keşfi hücre farklılaşması, organogenez gelişimini içeren biyolojik süreçler ve hastalıkların patogenezindeki genetik düzenlemelerin anlaşılmasında yeni bir olanak sağlamıştır.⁶⁷⁻⁶⁹ Kanseri patogenezinde rol alan miRNA'ların ekspresyonları mikrodizin, qRT-PZR ve northern blot analizi yöntemleri ile profillenebilmektedir. Birçok araştırma deregüle miRNA'ların tümör hücrelerinde hücre büyümesi, hücre invazyonu veya metastazı üzerinde etkili olduğunu göstererek bu deneysel yöntemlerin kullanışlı olduğunu kanıtlamıştır.⁷⁰ Ayrıca bu moleküllerin sıklığı ve benzersiz yapıları, biyolojik belirteç olmalarını ve tedavi amaçlı olarak kullanımlarına işaret etmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar miRNA'ların klinik agresiflik gösteren ve nükle eden durumlarda prognostik belirteç olarak öne çıktığını göstermektedir. MiRNA'ların yeni kanser belirteci olarak birçok avantajlı özelliği vardır.⁷¹

MikroRNA'ların Oluşumu

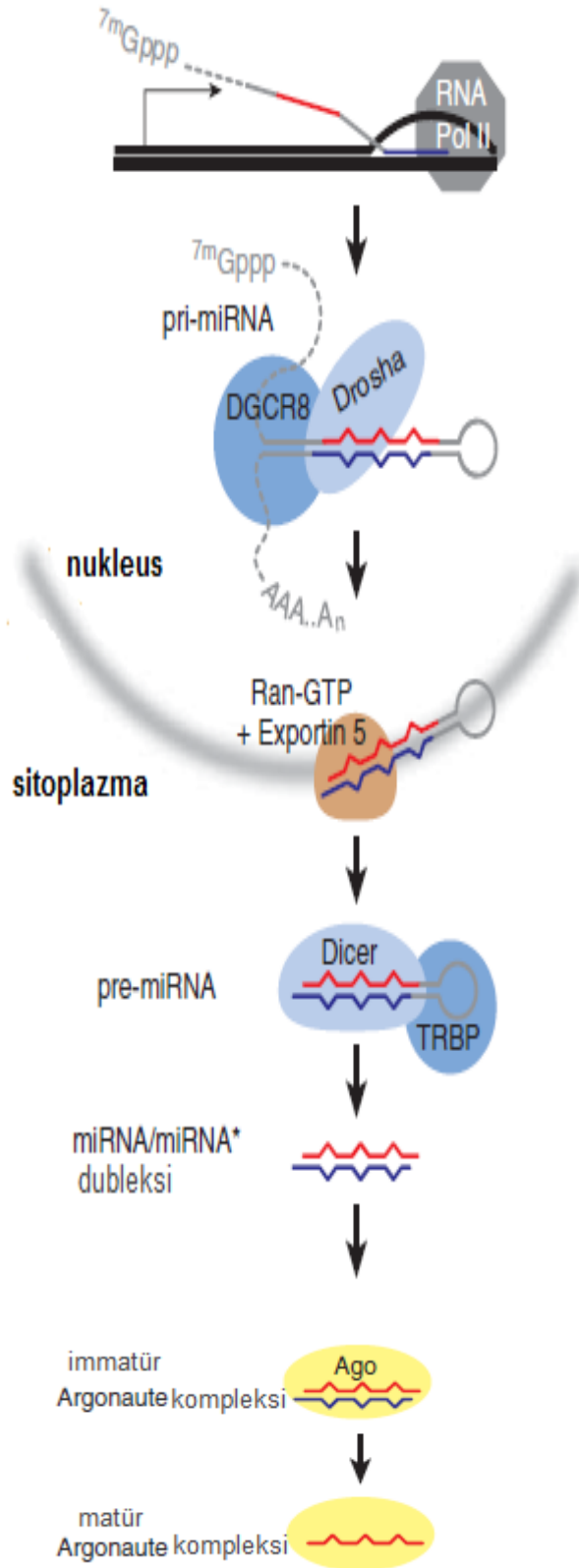
Hücre döngüsü ve büyüme üzerine düzenleyici etkileri olan küçük, protein kodlamayan RNA türü olan miRNA'lar, RNA polimeraz II (pol II) tarafından sentezlenmektedir. Yapılan son çalışmalar ile birçok farklı miRNA lokusunda RNA polimeraz III (pol III) ile ilişkili tekrar dizilerinin gösterilmesi pol III'ün de miRNA transkripsiyonunda önemli yeri olduğunu göstermiştir.⁷²⁻⁸²

MikroRNA'ların sentezi DNA'dan RNA polimeraz enzimi aracılığıyla öncü miRNA (pri-miRNA) sentezlenmesiyle başlar. Saç tokası şeklinde oluşan pri-miRNA nükleusta bulunan bir RNaz olan Drosha ve RNA bağlanma noktası bulunan bir protein DGCR8/Pahsa'dan oluşan mikroişlemci komplekse bağlanır ve 60 ile 70 nükleotidlik parçalar haline getirilerek pre-miRNA haline dönüştürülür.⁸²⁻⁸⁸

Bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı bir şekilde pre-miRNA molekülü sitoplazmaya taşınır.⁸⁹ RNAaz III enzimi ailesinden bir endonükleaz olan Dicer, TAR RNA bağlayan protein (TRBP) veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) aktive eden protein

(PACT) ile etkileşimde bulunarak sitoplazmada pre-miRNA'ı parçalayarak çift zincirli, 18-24 nükleotid uzunluğunda miRNA dubleksine dönüştürürler.⁹⁰ Dicer'in diğer fonksiyonu da RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi oluşumunda kilit rolü olmasıdır.⁹¹ Pre-miRNA'nın saplı, ilmikli yapısı Dicer tarafından kesildikten sonra miRNA dubleksinden sadece bir tanesi RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksine katılır. RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksinin ihtiva ettiği RNAaz olan Argonaute'un yardımı ile bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse katılır. Bu komplekse dahil olan yapı kılavuz iplik (guide iplik) olarak isimlendirilir. Diğer kılavuz olmayan ve yolcu iplik olarak adlandırılan iplik RISC kompleksi tarafından sindirilir. MiRNA'lar aktif RISC kompleksine katıldıktan sonra, ya Argonaute proteinleri aracılığıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun engellenmesine neden olurlar (Şekil 1).⁹²

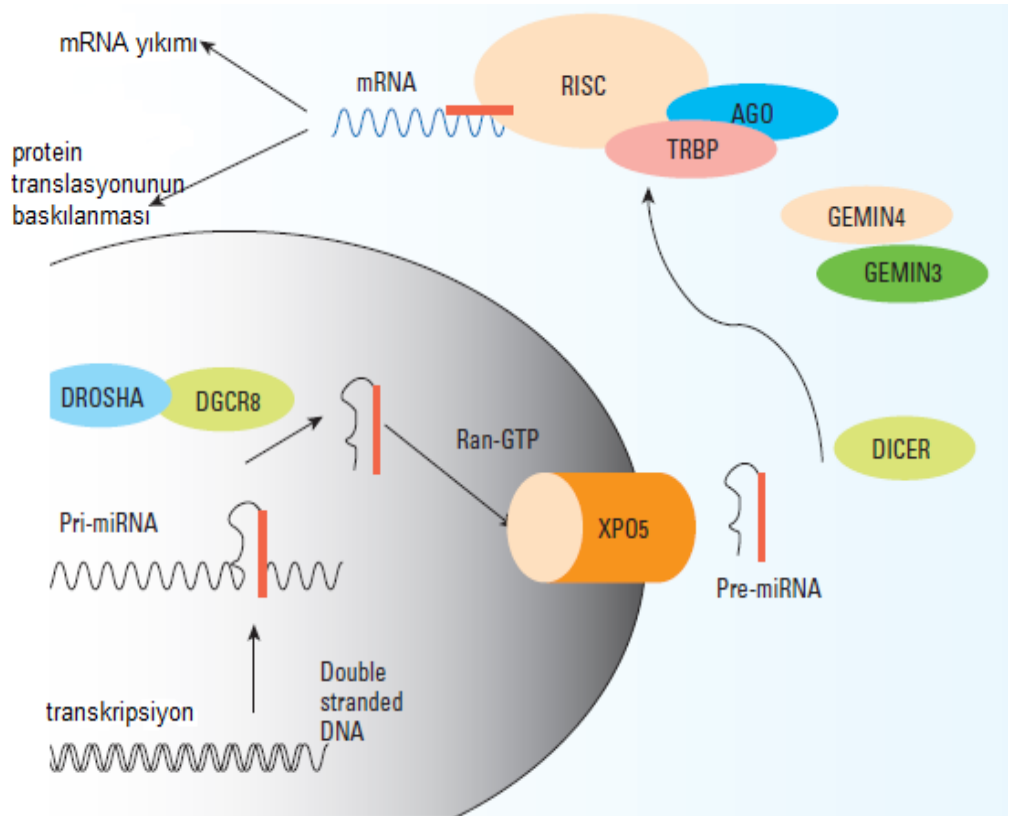
Şekil 1: MikroRNA oluşumu.⁹²



MikroRNA'ların Fonksiyonu

Olgun miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MiRNA'lar kendi nükleotid dizilerini tamamlayıcı hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. Kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahip miRNA'lar, RISC ile kompleks oluşturup baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlandıktan sonra protein translasyonunun inhibisyonuna ya da mRNA'nın yıkımına sebep olur.⁹⁴ MiRNA'ların herbirinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği ve mRNA'ların herbirinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği saptanmıştır (Şekil 2).^{92,93}

Şekil 2: MikroRNA oluşumu ve fonksiyonu⁽¹⁰⁹⁾.



MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesine (Untranslate Region-UTR) ya da hedef mRNA'nın ORF (Open Reading Frame- açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanır ve bağlanma

pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir. Translasyona uğramayan bölgesine bağlandığında; kusurlu, eksik tamamlayıcılıkla ve translasyonun baskılanmasıyla sonuçlanır.

ORF bölgesine bağlandığı takdirde bağlanma kusursuz, eksiksiz tamamlayıcılığı gösterir ve sonuçta Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı gerçekleşir.^{94,95}

MiRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı fonksiyon gösterebilirler.⁹⁶ Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar veya 'anti-oncomiR' olarak ifade edilmektedir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur. Bunun tersi durumunda ise, 'oncomiR' olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA'lar bir tümör baskılayıcısının baskılanmasını sağlarlar.⁹⁷ Son dönemde onkogenik miRNA'ları hedef alan (anti-miR, miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri) ve tümör baskılayıcı miRNA'ları hedef alan (miRNA mimikleri) miRNA tabanlı tedavi yaklaşımları üzerinde çalışılmaktadır.

MikroRNA'ların Klinik Önemi ve Hastalıklarla İlişkisi:

MiRNA'lar çoğunluğu hücre içinde yer alırken, birçok miRNA vücut sıvıları da dahil olmak üzere hücre dışında gözlenmiştir. Aktif olarak vücut sıvısındaki miRNA'ların iki tip hücre kökenli lipid vezikülleri olan mikrovezikül ve eksozomdan köken aldığı tanımlanmıştır. Mikroveziküller nispeten büyüktür (~ 100 nm 1 mikron) ve bu veziküller kabarcık oluşturarak hücreden salınırlar. Eksozomlar ise yaklaşık 30-100 nm büyüklüğünde küçük veziküller olup endozomlardan oluşan multiveziküler yapıların plazma membranıyla birleşmesi sonucunda oluşur. Eksozomlar, epitel hücreleri, T ve B hücreleri, dentrik hücreler ve kanser hücreleri gibi çeşitli hücrelerden salgılanmalarının yanı sıra plazma, serum, tükürük, anne sütü ve ürün gibi vücut sıvılarında da bulunurlar.⁹⁸ MiRNA'lar farklı sıvı tipleri arasındaki RNA'ların aksine stabil ve belirgin şekilde ekspresyon profilleri gösterirler.⁹⁹⁻¹⁰¹ Dolaşımdaki miRNA'lar hücre içermeyen

serum benzeri vücut sıvılarında RNAz'a, pH'ya ve sıcaklığın yüksek değişkenliğine karşı dayanıklıdır.¹⁰² Plazma, idrar veya anne sütü gibi insan vücut sıvılarında 200-500 arasında miRNA qPZR ile tespit edilmiştir. Vücut sıvılarında miRNA'ların tespiti kanser hastalarının tanısı için umut verici noninvaziv bir tanı yöntemidir.⁹⁹

Yapılan son çalışmalar ile miRNA'lardaki mutasyonlar ve ekspresyon düzensizlikleri ile birçok hastalık arasında direk bir ilişki olduğu gösterilmiştir. MiRNA'lar organizmada birçok biyolojik süreçte görev aldığı için, miRNA genlerinde meydana gelen çeşitli mutasyonlar hastalıklara neden olabilmektedir. MiRNA'ların başta kanser olmak üzere, kardiyovasküler bozukluklar, inflamatuvar hastalıklar, infeksiyonlar, gelişimsel bozukluklar, müsküler bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. MiRNA'ların modülasyonu ile ilgili ilk çalışma olan B hücre lenfoma hastalarının serumlarında mir-21 seviyesinin yüksek olması hastalığın tekrarlamadığı bireylerin hayatta kalma oranlarıyla ilişkilendirilmiştir.¹⁰³

MikroRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör baskılayıcı fonksiyon gösterebilirler.¹⁰⁴ Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lar tümör baskılayıcı miRNA'lar veya 'anti-onkomiR' olarak ifade edilir. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna neden olur. Bunun tam tersi durumda ise onkomiR olarak ifade edilen bazı miRNA'ların kanserin gelişimini arttırdığı görülmektedir. Bu miRNA2lar bir tümör baskılayıcısının baskılanmasını sağlarlar.¹⁰⁵ OnkomiR'ler bazı tümörlerde gen amplifikasyonu, epigenetik mekanizmalar veya transkripsiyonel bozukluklardan dolayı aşırı eksprese olurlar. Gelişmekte olan miRNA tabanlı tedaviler için iki yaklaşım vardır: onkogenik miRNA'ları hedef alan (antimiR, miRNA süngerleri ve miRNA maskeleri) ve tümör baskılayıcı miRNA'ları hedef alan (miRNA mimikleri) tedavilerdir.¹⁰⁶

GEREÇ VE YÖNTEM

Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları polikliniğine başvuran 18-80 yaş arası hastalardan tükürük bezleri ile ilgili şikayeti olmayan 17 hasta kontrol grubunu, tükürük bezi tümörü tanısı almış olup tarafımızca operasyonu yapılan 20 hasta ise hasta grubunu oluşturmuştur.

Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.05.2013 tarihli ve 2013/183 sayılı kararınca onaylandı ve çalışmaya katılan tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

İşlemlerde Ortak Kullanılan Sarf Malzemeler:

Pipet ucu 1-10 µL (Katalog No: DFL10, Gilson)

Pipet ucu 2-30 µL (Katalog No: DF30, Gilson)

Pipet ucu 10-100 µL (Katalog No: DF100, Gilson)

Pipet ucu 20-200 µL (Katalog No: DF200, Gilson)

Pipet ucu 100-1000 µL (Katalog No: DF1000, Gilson)

0.2 mL Thermo-Strip (8'li strip tüp, Thermo Scientific, UK)

2 mL'lik mikrosantrifüj tüpü (DNAz, RNAzsız)

96 Well PCR Plate (Katalog No: 1402-9400, USA Scientific)

PCR Plate Film (Katalog No: 2921-7800, USA Scientific)

İşlemlerde Ortak Kullanılan Cihazlar:

8 kanallı pipet 1-20 µL (Gilson)

8 kanallı pipet 20-200 µL (Gilson)

Pipet 2-20 µL (Gilson)

Pipet 10-100 µL (Gilson)

Pipet 20-200 µL (Gilson)

Pipet 100-1000 µL (Gilson)

Santrifüj (Nüve NF 800, Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat Ve Ticaret AŞ, Ankara, Türkiye)

Santrifüj (Sigma 1-15 Microfuge, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Postfach 1713, Germany)

Santrifüj (Sigma 1-14 Microfuge, SN: 141318, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Postfach 1713, Germany)

Derin dondurucu (-80 oC, Lab -85 oC, Elcold)

Derin dondurucu (-20 oC, Uğur Soğutma Makinaları San. Ve Tic. A.Ş.)

Buzdolabı (+ 4 oC, Electrolux)

Plate Karıştırıcısı (PKT Smart Mixer, Multi Shaker, JSH-03, SN: JMC-JSH03-1005, PhileKorea, Korea)

Plate santrifüjü (PKT Mini Multi-well plate centrifuge, JCW48, SN: PKT-JCW48-1057, PhileKorea, Korea)

Termal cycler (Gene-Pro Thermal Cycler, B384G, SN: BYQ606002E-060, Korea)

MiRNA Analizi

Tükürük Eldesi:

200 µL tükürük örneği ve 200 µL RNAlater (QIAGEN Inc., Valencia, CA) solüsyonu karıştırıldı oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra -80°C'de derin dondurucuda saklandı. (Park N. et al. Salivary microRNA: Discovery, Characterization, and Clinical Utility for Oral Cancer Detection. Clin Cancer Res. 2009 September 1; 15(17): 5473–5477. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0736).

Doku Eldesi:

Operasyon sonrası elde edilen yaklaşık 3-4 mm³büyükliğündeki doku parçaları 1 mL RNAlater (QIAGEN Inc., Valencia, CA) solüsyonu içine konuldu ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

Doku homojenizasyonu:

RNAlater solüsyonu içindeki dokular bir pens yardımıyla alınıp RNAlater'ın fazlası bir kağıt havluya emdirildi ve homojenizasyon tamponu içine konuldu. Homojenizasyon miRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) içeriğine uygun şekilde yapıldı.

Plazma Eldesi:

Çalışma gruplarından % 7,5 EDTA'lı tüplere alınan 5 ml'lik kan örnekleri yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılarak plazmaları ayrıldı.

1. Tüpler 4000 rpm de 15 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj işlemi sonunda tüpler dikkatlice santrifüjden çıkartıldı.
3. Plazmanın en üst kısmından 1000 µl olacak şekilde plazma toplandı.
4. Toplanan 1000 µl lik plazma 13000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve plazmanın en üst kısmından alttaki süpernatana dokunmadan pipet ile (DNase, RNase Free, filtrelili pipet uçları kullanılarak) 200 µl temiz bir mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Mikrosantrifüj tüpleri hastaya ait barkod etiketi ile etiketlendi.
5. Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

miRNA İzolasyonu:

miRNA'lar plazmadan, doku homojenizatından (süpernatant) ve tükürükten miRNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) ile kit içeriğine uygun şekilde izole edildi.

Protokol:

- 1- Örnekler en az 5 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve 150 µl'lik kısım temiz bir mikrosantrifüj tüpüne(DNase, RNase Free) alındı.
- 2- Örnekler üzerine 312 µl Binding Buffer ve 200 µl Binding Enhancer eklendi ve karıştırıldı.

- 3- Karıştırılan örnekler filtreli tüp+toplama kabına aktarıldı. 13000 g'de 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
- 4- Temiz toplama kaplarına alınan filtreli tüplere 500 µl Wash Buffer eklendi. 13000 g'de 30 sn. sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
- 5- Temiz toplama kaplarına alınan filtreli tüplere 300 µl Wash Buffer eklendi. 13000 g'de önce 30 saniye sonra 1 dakika sanrifüj edildi ve toplama kapları atıldı.
- 6- Filtreli tüpler temiz bir mikrosantrifüj tüpüne(DNase, RNase Free) alındı ve 50 µl Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilen örnekler 13000 g'de 1 dakika sanrifüj edildi.
- 7- Elde edilen total RNA -80°C'de derin dondurucuda saklandı.

cDNA Hazırlanması:

- Aşağıdaki karışım hazırlanır. Bu karışım 96 örneğin cDNA reaksiyonu için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

RT Buffer	168 µl
RT Primer Mix	84 µl
DNase, RNase-free su	84 µl
RT Enzyme	84 µl

Toplam: 420 µl

- Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 51 er µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 3.5 er µl alınarak temiz bir 96 lık Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.
- RNA örnekleri de her kuyuya, yukarıda transferi yapılan karışımların üzerine 3.5 er µl olmak üzere pipetlendi. Plate film ile kaplandı, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı.
- Vorteks ile 2 saniye karıştırılır, 4-5 saniye ara verilir bir kez daha vorteks ile 2 saniye karıştırıldı.

- Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edilir ve Plate Thermal Cyclers'a konularak aşağıdaki program çalıştırıldı.

37°C 60 dakika

95°C 5 dakika

4°C ∞

- Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi bekleni (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir).
- Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi. Bir plate taşıyıcı üzerine konuldu (plate'in kaymaması ve kıpırdamaması için gereklidir).
- Film açıldı. Bir rezervuara 5 mL kadar DNase, RNase-free su konuldu.
- Plate'in her kuyusuna 28 µl bu sudan eklendi. Yeni bir film ile plate kaplandı, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Vorteks ile 2 saniye karıştırıldı, 4-5 saniye ara verilir bir kez daha vorteks ile 2 saniye karıştırıldı.
- Plate el ile alt üst edilerek (bir kaç kez) karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

PreAmplifikasyon Hazırlanması:

- Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım 96 örneğin PreAmplifikasyon reaksiyonu için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir)

PreAMP Buffer	230 µl
PreAmp Master Mix	92 µl
PreAMP Primer Mix	230 µl
DNase, RNase-free su	322 µl
PreAMP Universal Primer	46 µl

Toplam: 920 µl

- Bu karışım bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 113'er µl olarak transfer edildi. Buradan 8 kanallı pipet yardımı ile 8'er µl alınarak temiz bir 96 lık Plate'in tüm kuyularına pipetlendi.
- Bir önceki aşamada sulandırılmış olan cDNA örneklerinden her kuyuya 2'şer µl olmak üzere pipetlendi.
- Plate, film ile kaplandı, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Vortex ile 2 saniye karıştırıldı. Plate santrifüjde 1 dakika santrifüj edildi ve Thermal Cyler da "96 PreAmp Protokolü" çalıştırıldı.

96 PreAmp Protokolü

95°C 15 dakika Başlangıç Denatürasyonu

94°C 30 saniye } 12 Döngü
60°C 3 dakika }

4°C ∞

- Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi. Bir 8'li strip tüpün tüm kuyularına 14'er µl Exonuclease I'den pipetlendi (bu strip tüp kapatılarak derin dondurucuda saklanıp bir sonraki deneyde kullanılabilir). PreAmp plate'inin strip kapakları açıldı. Her kuyuya 0.8 µl Exonuclease I solüsyonundan pipetlendi. Plate yeni bir film ile kaplandı, plate karıştırıcı 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Vortex ile 2 saniye karıştırıldı (bu karıştırma 2 kez daha her defasında 4-5 saniye ara vererek tekrarlandı). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.
- Plate Thermal Cyler'a konularak aşağıdaki program çalıştırıldı.

37°C 15 dakika

95°C 5 dakika

4°C ∞

- Thermal programın sonunda plate'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi (deney bitiminde yüzeyi sıcak olabilir). Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi. Film açıldı. Her kuyuya 39.2 µl DNase, RNase free su eklendi. Yeni bir film ile plate kaplandı, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Vortex ile 2 saniye karıştırıldı (bu karıştırma 2 kez daha her defasında 4-5 saniye ara vererek tekrarlandı). Plate el ile alt üst edilerek (bir kaç kez) karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

Dynamic Array Hazırlanması:

Bu aşamada 6 ayrı adım vardır;

1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi,
2. Assay Plate'inin hazırlanması,
3. Örneklerin hazırlanması,
4. Dynamic Array'e pipetlemelerin yapılması,
5. IFC Controller da Dynamic Array'in Load edilmesi,
6. Dynamic Array'in BioMark da çalışılması.

1. Dynamic Array'in PRIME edilmesi:

Bir adet Dynamic Array'e control fluid lar enjekte edilir ve Dynamic Array IFC Controller da PRIME edilir. Bu işlem tam 20 dakika sürecektir. PRIME işlemi devam ederken aşağıdaki aşamaya geçilir.

2. Assay Plate'inin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlandı. Bu karışım bir adet Assay Plate için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplamaya dahil edilmiştir).

PCR Universal Primer	180 µl
2x Assay Loading Reagent (Fluidigm, cat. no. PN 85000736, yellow cap)	360 µl
RNase-free water	180 µl

Toplam: 720 µl

Bu karışım bir 8 li strip tüpün tüm kuyularına 88 er µl olarak transfer edildi. Assay plate paketinden çıkarılır ve bir plate taşıyıcı üzerine konuldu (plate'in kaymaması ve kırıdamaması için gereklidir). 8 li strip tüp den 6 şar µl alınarak Assay Plate'in tüm kuyularına pipetlendi. Assay Plate film ile kaplanır. Plate karıştırıcı üzerine plate konulur ve el ile bastırılarak 10 saniye vortekslendi. Bu işlem 3 kez her defasında 4-5 saniye ara verilerek tekrarlandı. Plate santrifüj de 2 dakika santrifüj edildi.

3. Örneklerin Hazırlanması:

Aşağıdaki karışım hazırlanır. Bu karışım bir set (96 örnek) için yeterlidir (ekstra hacimler hesaplama dahil edilmiştir).

qPCR Master Mix	360 µl
20x DNA Binding Dye	36 µl
Sample Loading Reagent (Fluidigm, PN 100-3738)	
RNase-free water	84 µl

Toplam: 480 µl

Bu karışım bir piko plate in ilk kolonunun 8 kuyusuna (1 er atlayarak) 58 er µl olarak transfer edildi. Bu karışımdan 4 er µl temiz bir 96 lık plağın tüm kuyularına pipetlendi. Sulandırılmış olan PreAmplifiye ürünlerin üzerindeki film açıldı. Herbir PreAmplifiye örnek den 2 şer µl bu plate' e transfer

edildi. Plate yeni bir film ile kaplandı. Plate, plate karıştırıcıda 2000 rpm de 3 dakika karıştırıldı. Vortex ile 2 saniye karıştırıldı (bu karıştırma 2 kez daha her defasında 4-5 saniye ara vererek tekrarlandı). Plate el ile alt üst edilerek (bir kaç kez) karıştırıldı. Plate santrifüj de 1 dakika santrifüj edildi.

4. Dynamic Array'e Pipetlemelerin Yapılması:

Assay pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl) de şu program yapıldı: Aspirate 4.75 µl, Dispense 4.50 µl. Tüm kuyulardaki Assay'ler bu şekilde Dynamic Array'e transfer edildi. Örnek pipetlemeleri için Viaflo Voyager (12.5 µl)'de Assay için yapılan program kullanıldı. Tüm kuyulardaki örnekler bu şekilde Dynamic Array'e transfer edildi.

5. IFC Controller'da Dynamic Array'in yüklenmesi:

Dynamic Array IFC Controller'a yerleştirildi ve LOAD Seçeneği seçilerek LOAD işlemi başlatıldı. Bu işlemi başlattıktan sonra BioMark Data Collection yazılımı başlatıldı ve "Double Click to Turn Lamp On" kısmına çift tıklanarak BioMark'ın lambası çalıştırıldı. Lambanın ısınması 20 dakika sürer.

6. Dynamic Array'in BioMark'da çalışılması:

Dynamic Array IFC Controller'dan alındı. Dynamic Array altındaki mavi filmin uzaklaştırıldığından emin olundu. Chip yüzeyinin temiz olup olmadığı kontrol edildi. Dynamic Array BioMark'a barkod kısmı dışarı bakacak şekilde yerleştirildi. BioMark Data Collection yazılımı yardımı ile Dynamic Array çalıştırıldı. "Gene Expression" seçildi. Passive Reference Dye olarak "ROX" seçildi. "Probe Type" kısmında "EvaGreen" seçildi. Sonraki ekranda Prokoller arasından "miRNA EvaGreen Protocol" seçildi ve Program başlatıldı.

İstatistiksel Analiz

Sürekli ölçümlere ait normallik kontrolü Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasında ve cinsiyetler bazında yaşlar bakımından fark olup olmadığı Student t testi ile test edilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar için Pearson ki-kare ve Likelihood ratio ki-kare testleri kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. İstatistik anlamlılık olarak $p < 0.05$ alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 20 hasta grubunun yaş ortalaması 53.1 ± 17.5 , 17 sağlıklı bireye ait yaş ortalaması ise 46.4 ± 17.3 olarak hesaplanmış ve bu aradaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.251$). Ayrıca, çalışmaya alınan 18 kadının yaş ortalaması 47.9 ± 17.4 olup erkeklerin yaş ortalaması ise 51.9 ± 17.8 olarak hesaplanmış ve cinsiyetlere göre de yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.488$).

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları.

	Grup	N	Ort.	S. Sapma	P
Yaş	Hasta	20	53,1	17,5	0,251
	Kontrol	17	46,4	17,3	

Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarındaki cinsiyet dağılımı.

			GR		Total
			hasta	kontrol	
cinsiyet	kadin	Count	10	8	18
		% within cinsiyet	55,6%	44,4%	100,0%
		% within GR	50,0%	47,1%	48,6%
erkek	erkek	Count	10	9	19
		% within cinsiyet	52,6%	47,4%	100,0%
		% within GR	50,0%	52,9%	51,4%

Total	Count	20	17	37
	% within cinsiyet	54,1%	45,9%	100,0%
	% within GR	100,0%	100,0%	100,0%

Çalışmaya alınan 20 hastanın postoperatif patoloji sonuçlarının 7 tanesi Warthin tümörü (%35), 6 tanesi pleomorfik adenom(%30), 1 tanesi adenokarsinom(%5), 2' si skuamöz hücreli karsinom (%10), 1'i mukoepidermoid karsinom(%5), 2'si lenfoepitelyal kist(%10) ve 1 tanesi inflamatuvar psödötümör(%5) olarak raporlanmıştır. (Tablo 3)

Tablo 3: Hasta grubunda tümör tiplerinin dağılımı

Tümörün tipi	Warthin tumoru	7	35,0
	Pleomorfik adenom	6	30,0
	Adenokarsinom	1	5,0
	Skuamöz hücreli karsinom	2	10,0
	Mukoepidermoid karsinom	1	5,0
	Lenfoepitelyal kist	2	10,0
	İnflamatuvar psödötumor	1	5,0

Hasta ve kontrol gruplarından alınan periferik kan örneğinden toplam 95 miRNA analizi yapıldı. Bunlardan 24 tanesinin artan ya da azalan düzeyde eksprese olduğu, ancak 8 tanesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.05$). Panelde yer alan diğer

miRNA ekspresyon seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4).

Tablo 4. Hasta ve kontrol gruplarında serum miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

miRNA	Fold Regulation	P value
hsa-let-7a-5p	-2,4404	0,149153
hsa-let-7c-5p	-1,8888	0,13821
hsa-let-7d-5p	-1,5703	0,504327
hsa-let-7e-5p	-2,0304	0,16598
hsa-let-7f-5p	-1,3802	0,285221
hsa-miR-17-5p	-4,0486	0,174763
hsa-miR-17-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-21-5p	-2,2391	0,043303
hsa-miR-23a-3p	-12,586	0,00001
hsa-miR-25-3p	-2,4655	0,442446
hsa-miR-26b-5p	-1,3741	0,285304
hsa-miR-27a-3p	-21,0002	0,000229
hsa-miR-31-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-92a-3p	-1,106	0,948806
hsa-miR-95-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-96-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-100-5p	-2,0033	0,126955
hsa-miR-107	1,0479	0,567011
hsa-miR-199a-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-199a-3p	-2,8646	0,102119
hsa-miR-30c-5p	-2,1444	0,226051
hsa-miR-139-5p	1,8538	0,18885
hsa-miR-10a-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-34a-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-181a-5p	1,0479	0,567011

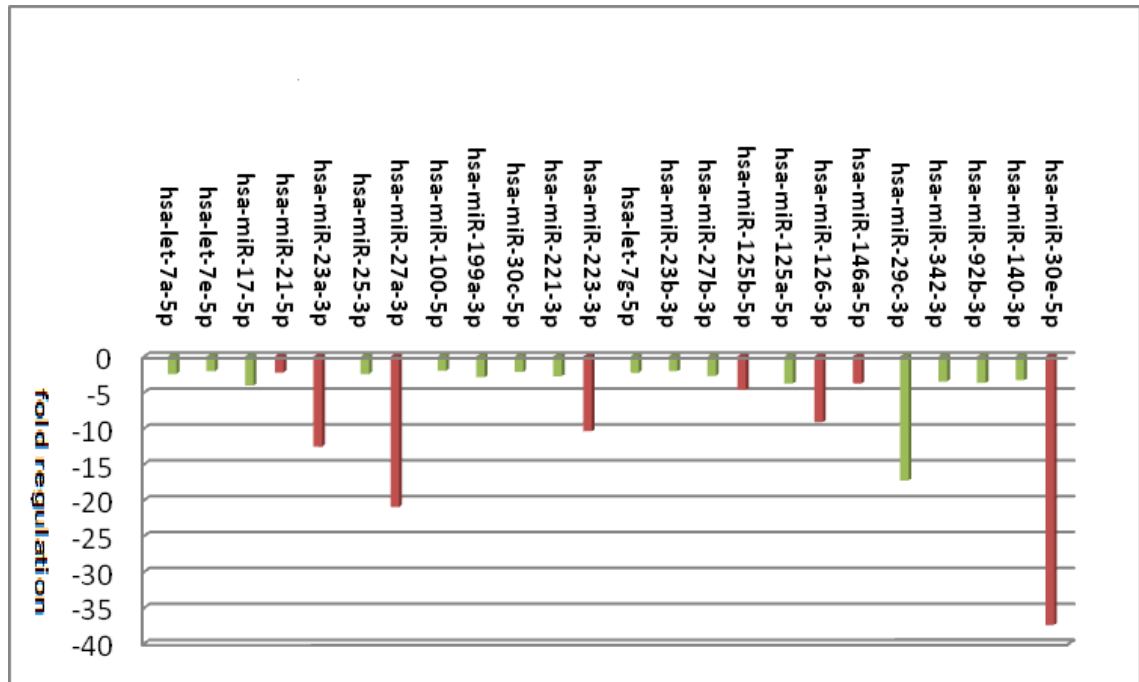
hsa-miR-181c-5p	-1,323	0,286228
hsa-miR-204-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-205-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-215-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-221-3p	-2,7604	0,089978
hsa-miR-223-3p	-10,4112	0,001118
hsa-miR-224-5p	1,0479	0,567011
hsa-let-7g-5p	-2,2786	0,113299
hsa-miR-1-3p	-1,4298	0,284804
hsa-miR-23b-3p	-2,0337	0,154514
hsa-miR-27b-3p	-2,704	0,057982
hsa-miR-30b-5p	-1,9633	0,121851
hsa-miR-122-5p	-1,3847	0,230905
hsa-miR-125b-5p	-4,6442	0,031799
hsa-miR-128-3p	-1,0098	0,948743
hsa-miR-133a-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-138-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-140-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-142-3p	-1,4414	0,356365
hsa-miR-9-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-125a-5p	-3,7675	0,120201
hsa-miR-126-3p	-9,1403	0,000063
hsa-miR-146a-5p	-3,7517	0,024689
hsa-miR-184	1,0479	0,567011
hsa-miR-200c-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-155-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-29c-3p	-17,3011	0,111671
hsa-miR-200a-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-302a-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-34c-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-299-3p	1,0479	0,567011

hsa-miR-302b-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-302c-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-367-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-370-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-371a-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-373-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-374a-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-375	1,0479	0,567011
hsa-miR-376a-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-382-5p	-1,0732	0,852485
hsa-miR-330-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-342-3p	-3,4903	0,067632
hsa-miR-133b	1,0479	0,567011
hsa-miR-345-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-20b-5p	1,1841	0,679678
hsa-miR-146b-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-299-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-92b-3p	-3,6538	0,742515
hsa-miR-21-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-92a-1-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-92a-2-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-139-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-221-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-140-3p	-3,3251	0,662111
hsa-miR-125a-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-155-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-29c-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-379-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-340-5p	1,0136	0,816895
hsa-miR-330-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-342-5p	1,0479	0,567011

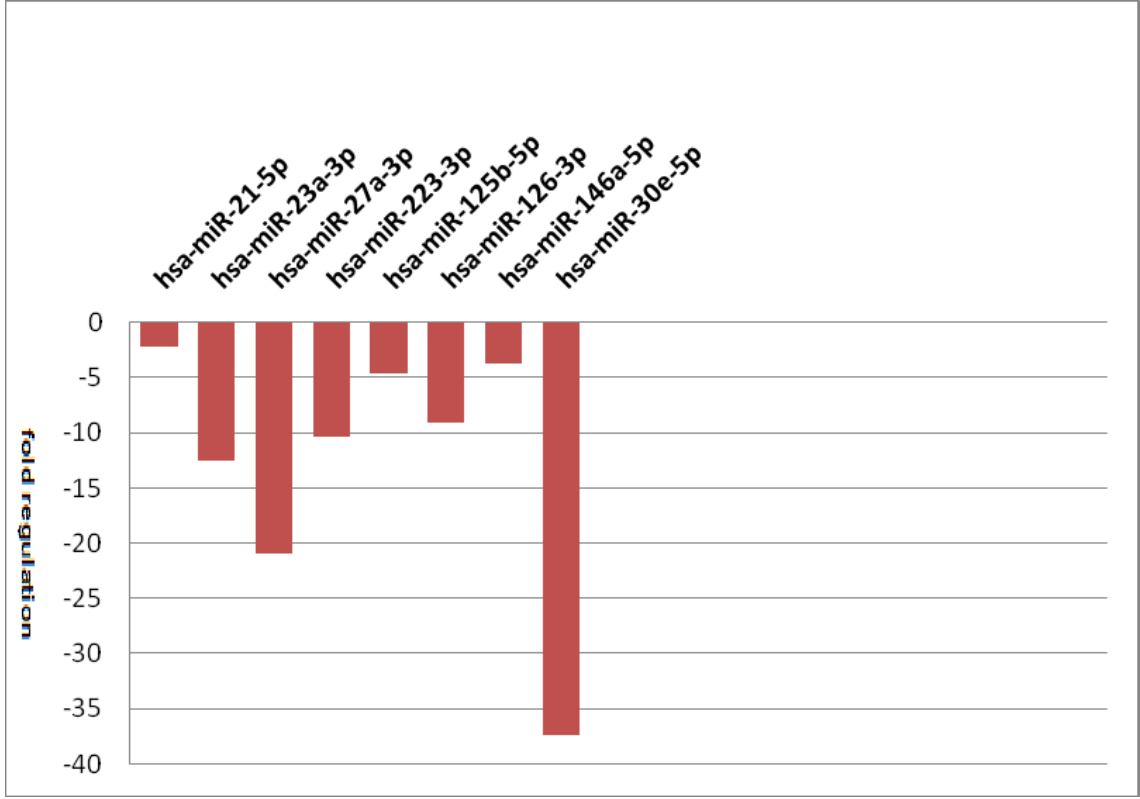
hsa-miR-146b-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-92b-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-374b-5p	-1,3871	0,285145
hsa-miR-345-3p	1,0479	0,567011
hsa-miR-372-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-494-5p	1,0479	0,567011
hsa-miR-30e-5p	-37,4314	0,001727
hsa-miR-337-5p	1,0479	0,567011
Global Mean	1	0

Hasta grubunda ekspresyonları istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalan miRNA'lar; **hsa-miR-21-5p**, **hsa-miR-23a-3p**, **hsa-miR-27a-3p**, **hsa-miR-223-3p**, **hsa-miR-125b-5p**, **hsa-miR-126-3p**, **hsa-miR-146a-5p**, **hsa-miR-30e-5p** olarak görüldü (Şekil 3, Şekil 4). Ekspresyonları anlamlı olarak artan miRNA saptanmadı.

Şekil 3: Hasta grubunda plazmada azalma gösteren miRNA'ların fold regulation değerlerinin grafiksel ifadesi. Bunlardan istatistiksel olarak anlamlı eksprese olanlar kırmızı renkle gösterilmiştir.



Şekil 4: Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA'ların ekspresyon oranlarının grafiksel ifadesi.



Tablo 5: Hasta ve kontrol gruplarında tükürük örneklerindeki miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması.

miRNA	Fold Regulation -tükürük	P value
hsa-let-7a-5p	-1,7421	0,359322
hsa-let-7c-5p	1,2825	0,421645
hsa-let-7d-5p	-1,2001	0,448384
hsa-let-7e-5p	-2,5983	0,35197
hsa-let-7f-5p	-1,1237	0,527194
hsa-miR-17-5p	-1,695	0,251677
hsa-miR-17-3p	-1,4026	0,28253
hsa-miR-21-5p	-1,6358	0,48581

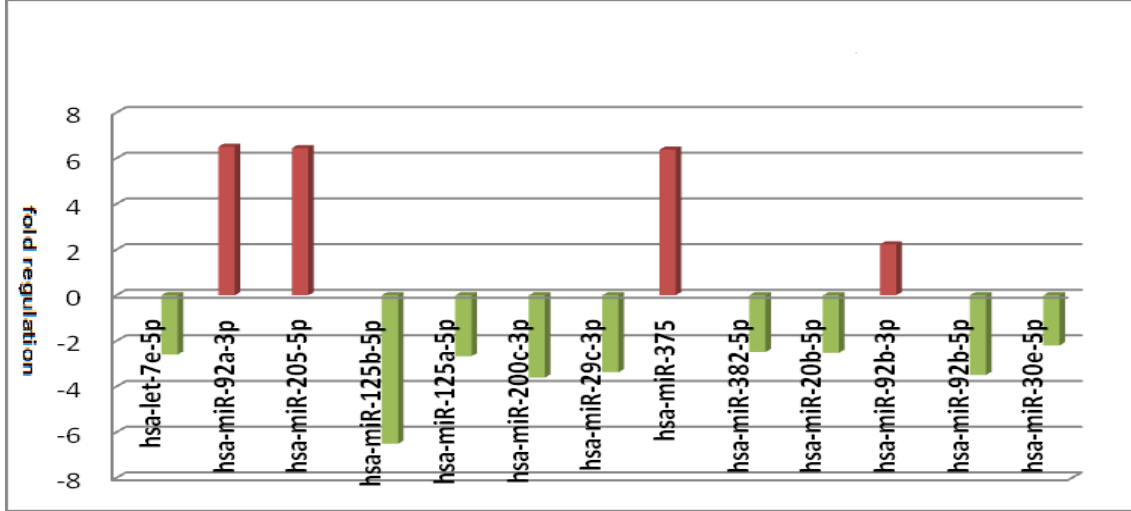
hsa-miR-23a-3p	1,1204	0,7942
hsa-miR-25-3p	-1,3331	0,603802
hsa-miR-26b-5p	-1,2212	0,406351
hsa-miR-27a-3p	1,0212	0,538299
hsa-miR-31-5p	1,0144	0,993569
hsa-miR-92a-3p	6,5064	0,207715
hsa-miR-95-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-96-5p	-1,3886	0,282941
hsa-miR-100-5p	1,2345	0,372798
hsa-miR-107	-1,0497	0,480165
hsa-miR-199a-5p	-1,5822	0,280582
hsa-miR-199a-3p	-1,3679	0,310131
hsa-miR-30c-5p	-1,381	0,320319
hsa-miR-139-5p	-1,3827	0,283139
hsa-miR-10a-5p	-1,1794	0,311504
hsa-miR-34a-5p	1,306	0,737913
hsa-miR-181a-5p	1	0,829765
hsa-miR-181c-5p	-1,0451	0,518279
hsa-miR-204-5p	-1,3127	0,287371
hsa-miR-205-5p	6,4475	0,57135
hsa-miR-215-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-221-3p	1,8959	0,329132
hsa-miR-223-3p	-1,8359	0,522974
hsa-miR-224-5p	1,2022	0,405342
hsa-let-7g-5p	-1,758	0,408794
hsa-miR-1-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-23b-3p	-1,4649	0,41615
hsa-miR-27b-3p	-1,1017	0,416767
hsa-miR-30b-5p	-1,261	0,366542
hsa-miR-122-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-125b-5p	-6,5052	0,283102

hsa-miR-128-3p	1,4572	0,416354
hsa-miR-133a-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-138-5p	-1,357	0,284214
hsa-miR-140-5p	-1,3682	0,2837
hsa-miR-142-3p	1,1132	0,5105
hsa-miR-9-5p	-1,3766	0,283361
hsa-miR-125a-5p	-2,6704	0,32697
hsa-miR-126-3p	-1,2643	0,30924
hsa-miR-146a-5p	-1,1428	0,330748
hsa-miR-184	1,2359	0,609624
hsa-miR-200c-3p	-3,5995	0,346484
hsa-miR-155-5p	-1,289	0,290255
hsa-miR-29c-3p	-3,3711	0,27844
hsa-miR-200a-3p	-1,1528	0,337207
hsa-miR-302a-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-34c-5p	1,4939	0,299214
hsa-miR-299-3p	-1,3003	0,28874
hsa-miR-302b-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-302c-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-367-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-370-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-371a-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-373-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-374a-5p	-1,8284	0,218346
hsa-miR-375	6,3765	0,701715
hsa-miR-376a-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-382-5p	-2,4846	0,441482
hsa-miR-330-3p	1,0941	0,831364
hsa-miR-342-3p	1,6727	0,8062
hsa-miR-133b	1,2359	0,609624
hsa-miR-345-5p	-1,1608	0,451251

hsa-miR-20b-5p	-2,5198	0,121862
hsa-miR-146b-5p	-1,0937	0,374628
hsa-miR-299-5p	-1,4111	0,282316
hsa-miR-92b-3p	2,2245	0,142936
hsa-miR-21-3p	1,1924	0,411173
hsa-miR-92a-1-5p	-1,7264	0,239148
hsa-miR-92a-2-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-139-3p	1,1237	0,839264
hsa-miR-221-5p	-1,2626	0,295283
hsa-miR-140-3p	-1,7019	0,24555
hsa-miR-125a-3p	-1,2151	0,283132
hsa-miR-155-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-29c-5p	-1,4528	0,281541
hsa-miR-379-3p	-1,1927	0,333387
hsa-miR-340-5p	-1,7713	0,15811
hsa-miR-330-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-342-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-146b-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-92b-5p	-3,4921	0,427361
hsa-miR-374b-5p	-1,7088	0,261652
hsa-miR-345-3p	1,2359	0,609624
hsa-miR-372-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-494-5p	1,2359	0,609624
hsa-miR-30e-5p	-2,1967	0,262237
hsa-miR-337-5p	-1,2713	0,293339
Global Mean	1	0

Hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı olarak azalan veya artan miRNA saptanmadı. (Şekil 5).

Şekil 5: Hasta grubunun tükürük örneklerinde artma veya azalma gösteren miRNA'ların ve ekspresyon oranlarının grafiksel ifadesi. Artanlar kırmızı, azalanlar yeşil renkle gösterilmiştir.



Tablo 6: Hasta grubunda plazma, doku ve tükürük örneklerindeki miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu gösteren tablo. N/A: korelasyon olmadığı anlamına geliyor.

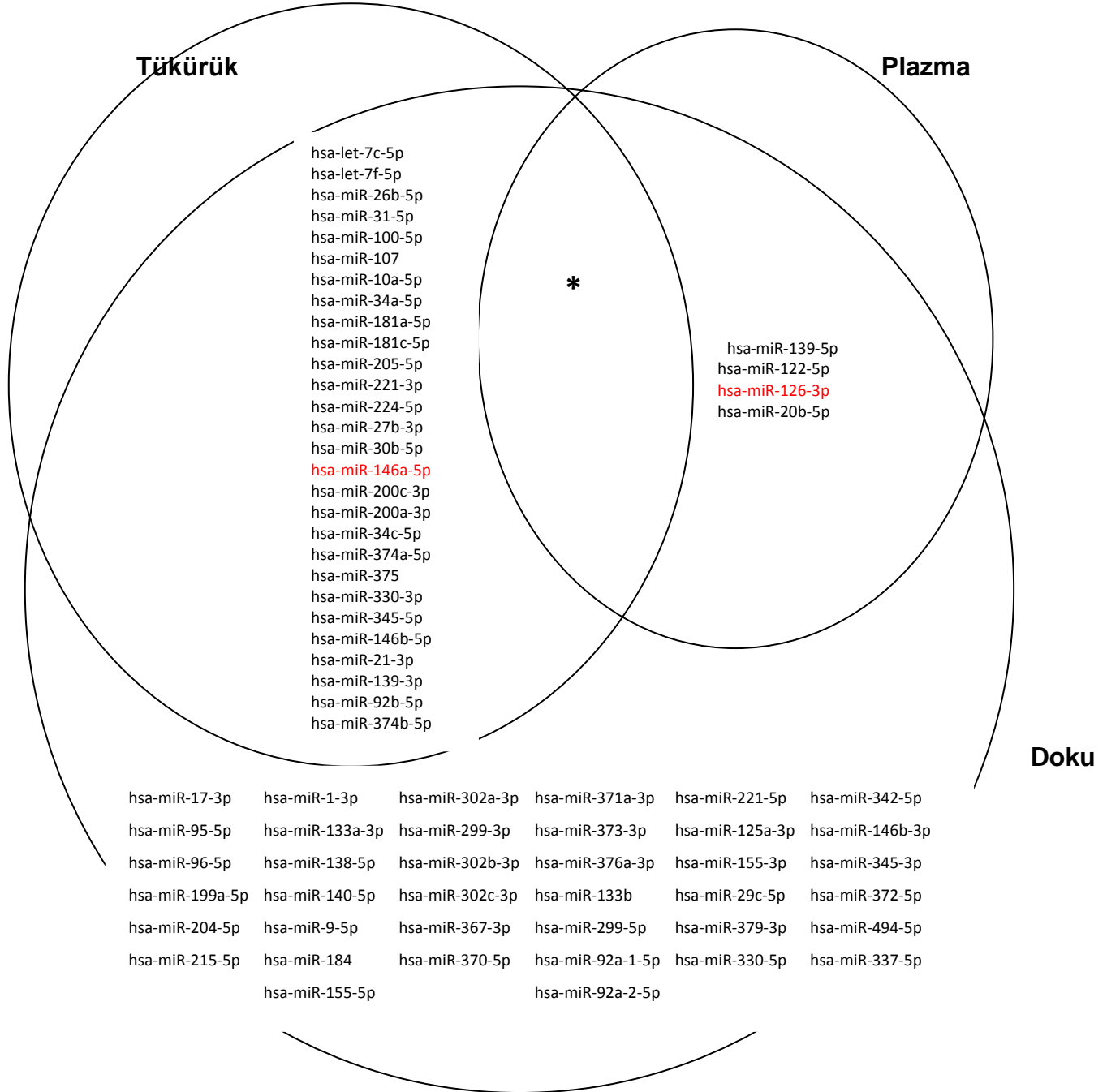
	H Plasma&H Tukruk	H Plasma&H Doku	H Tukruk&H Doku
hsa-let-7a-5p	N/A	-0,87	N/A
hsa-miR-17-5p	N/A	0,23	N/A
hsa-miR-21-5p	0,61	0,31	0,08
hsa-miR-23a-3p	0,41	0,17	0,05
hsa-miR-25-3p	-1	-0,23	0,76
hsa-miR-27a-3p	0,74	0,18	-0,002
hsa-miR-92a-3p	-0,16	-0,15	-0,45
hsa-miR-30c-5p	N/A	N/A	-1
hsa-miR-139-5p	N/A	-1	N/A
hsa-miR-34a-5p	N/A	N/A	-0,63
hsa-miR-205-5p	N/A	N/A	-0,68
hsa-miR-221-3p	N/A	N/A	0,74

hsa-miR-223-3p	0,24	0,06	0,45
hsa-let-7g-5p	N/A	-1	N/A
hsa-miR-23b-3p	N/A	N/A	-0,85
hsa-miR-27b-3p	N/A	N/A	-0,88
hsa-miR-30b-5p	N/A	N/A	-1
hsa-miR-122-5p	N/A	-0,006	N/A
hsa-miR-128-3p	N/A	N/A	1
hsa-miR-142-3p	N/A	N/A	-0,51
hsa-miR-125a-5p	N/A	0,31	1
hsa-miR-126-3p	N/A	0,44	N/A
hsa-miR-200c-3p	N/A	N/A	-0,71
hsa-miR-29c-3p	N/A	0,49	-1
hsa-miR-34c-5p	N/A	N/A	1
hsa-miR-375	N/A	N/A	-0,17
hsa-miR-382-5p	N/A	-1	0,67
hsa-miR-330-3p	N/A	N/A	1
hsa-miR-342-3p	-1	0,39	-0,21
hsa-miR-345-5p	N/A	N/A	-1
hsa-miR-20b-5p	N/A	0,3	N/A
hsa-miR-92b-3p	-0,4	0,29	0,28
hsa-miR-140-3p	N/A	0,37	N/A
hsa-miR-92b-5p	N/A	N/A	-0,47
hsa-miR-30e-5p	N/A	-0,22	N/A

Tablo 7: Hasta grubundaki tüm miRNA'lar için plazma-tükürük, plazma-doku ve tükürük-doku örnekleri arasındaki ortalama korelasyon katsayıları.

Korelasyon (tüm miRNA'lar için)	H Plazma&H Tukruk	0,05134687
	H Plazma&H Doku	0,063729755
	H Tukruk&H Doku	0,374435009

Şekil 6: Hasta grubunda doku, plazma ve tükürük örneklerinde miRNA ekspresyon varlığını gösteren venn şeması.



*

hsa-let-7a-5p **hsa-miR-21-5p** hsa-miR-199a-3p hsa-miR-23b-3p hsa-miR-125a-5p hsa-miR-92b-3p
 hsa-let-7d-5p **hsa-miR-23a-3p** hsa-miR-30c-5p **hsa-miR-125b-5p** hsa-miR-29c-3p hsa-miR-140-3p
 hsa-let-7e-5p hsa-miR-25-3p **hsa-miR-223-3p** hsa-miR-128-3p hsa-miR-382-5p hsa-miR-340-5p
 hsa-miR-17-5p **hsa-miR-27a-3p** hsa-let-7g-5p hsa-miR-142-3p hsa-miR-342-3p **hsa-miR-30e-5p**
 hsa-miR-92a-3p

TARTIŞMA

Tükürük bezi tümörleri nadir rastlanan tümörler olup anamnez, fizik muayene, radyolojik tetkikler ile teşhis edilirler. Kesin tanı ise ancak spesimenin histopatolojik incelemesi ile konulur. Az görülen tümörler olmaları ve çok çeşitli histopatolojik tipler içermeleri tanı koymayı zorlaştırmaktadır. Tükürük bezi tümörlerinin çoğu, tükürük bezinin içinde ya da komşuluğunda asemptomatik kitleler şeklinde belirir. Parotisin tümörleri tüm tükürük bezi tümörlerinin %70-80 kadardır ve yaklaşık % 80 benigndir. Diğer yandan submandibuler, sublingual ve minör tükürük bezlerinde malignite oranı daha yüksektir. Benign tümörler sıklıkla mobil, yarı sert, ağrısız ve yavaş büyüyen kitlelerdir. Malign tümörler ise sıklıkla fiksasyon gösteren, sert, bazı durumlarda, ağrılı, ileri devrelerde hızlı büyüyen kitlelerdir. Benign tümörler hastada uzun süre hiç semptom vermeden kalabilir. Hasta estetik deformite ile hekime müracaat edebilir. Tedavide birinci seçenek cerrahidir. Pleomorfik adenom, tükürük bezi tümörleri arasında en sık rastlanılanıdır. Pleomorfik adenom vakalarında cerrahi tedaviden sonra rekürrense rastlanmakta ve 1-46 yıl arasında rekürrensler ortaya çıkabilmektedir.¹⁰⁷ Bu tümörlerde malign transformasyon nadir bir durumdur ve olguların %3-4'ünde görülmektedir.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ Karsinoma ex-pleomorfik adenom olarak adlandırılan malign tip sıklıkla uzun süreli veya rekürrens durumlarında görülmektedir.¹⁰⁸ Tükürük bezi tümörlerinde tedavi yaklaşımı tümörün büyüklüğü, lokal yayılımı, histopatolojisi, lenf nodu tutulumu ve evresine göre şekillendirilir. Parotise ait benign tümörlerde, tümör daha çok parotis kuyruğunda yerleşimli olduğundan süperfisyal parotidektomi en çok kullanılan tekniktir. Tümörün derin lobu tuttuğu olgularda ise total parotidektomi tercih edilen tedavi modalitesidir. Parotidektomi sonrası fasiyal sinir paralizi sinirin iatrojenik olarak kesilmesiyle veya iskemik nedenlere bağlı gelişebilmektedir. Malign histopatolojiye sahip hastaların boyun tedavisinde klinik olarak belirgin metastaz mevcut ise primer tümörün rezeksiyonu ile birlikte boyun diseksiyonu yapılır. Gerekli olgularda ise boyun diseksiyonu ve kemoradyoterapi ile tedavi kombine edilmektedir.

Kompleks progresyonları, cerrahi sırasında yaşanan sıkıntılar, cerrahi sonrası görülebilen rekürrensler ve gelişebilecek malign transformasyon bu tümörlerde başka tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilmesi için ihtiyaç oluşturmaktadır. Son dönemlerde yapılan çalışmalarda neoplaziler için en çok umut vadeden tanısal belirteçlerden biri de miRNA'lardır. MiRNA'lar kısa, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlamayan tek sarmallı RNA çeşitleridir. Gen ekspresyonu düzenlenmesinde görevli olan miRNA'ların birçok kanserin patogeneziinde rol oynadığı gösterilmiştir ve yeni bir gen regülatörü sınıfı olarak düşünülmektedir. Olgun miRNA'ların kompleks olmamaları, bilinen bir modifikasyona uğramamaları, varlıklarının ve ekspresyon düzeylerinin kolayca tespit edilebilmesi, dokuya özgü ekspresyon profillerinin olması ve stabilitelerinin mRNA'lardan çok daha yüksek olması^{110,111} miRNA'ları fizyopatolojik durumların açıklanabilmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilmeleri için ideal adaylardan yapmaktadır.^{112,113} MiRNA'lar, hücre gelişimi, çoğalması ve hücre apoptozuyla ilişkilendirilmiş, yer ve zamana göre değişen ekspresyonlarına bağlı olarak hemen hemen her hücresel işlemde düzenleyici etkileri bildirilmiştir. Son çalışmalar miRNA'ların düzensizliğinin insan tümörlerinin oluşumunda, kanser patogenezi, kanserin başlangıcı, ilerlemesi ve metastazı da dahil olmak üzere birçok aşamada etkili rol oynadığını göstermiştir.^{114,115} MiRNA'ların tümör onkogen veya tümör baskılayıcı genler olarak hareket ettikleri bu çalışmalarda rapor edilmiştir.¹¹⁶ Dokuların yanısıra miRNA'ların dolaşımdaki varlıkları da tesbit edilmiştir.¹¹⁷ Şimdiye kadar serum, tükürük ve ürede bulunan miRNA'ların kanser dahil birçok patoloji ile ilişkilendirildiği, ek olarak anne sütü, kolostrum, meni, gözyaşı, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı, plevral sıvı ve periton sıvılarında da varlıkları gösterilmiştir.¹¹²

Literatür incelendiğinde miRNA ile tükürük bezi tümörlerinin ilişkisini irdelleyen çalışmaların az sayıda olduğu, genelde yalnızca plazma ,tükürük ya da doku örneğinde yapıldığı dikkati çekmektedir. Ancak elde edilen sonuçlar doku, tükürük ve plazma örneklerinde korelasyon olup olmadığı konusunda fikir vermemektedir. Biz çalışmamızda tükürük bezi tümörü olan hastaların kanında,

tükürük bezi dokusundan ve tükürük salgısında mikroRNA ekspresyonunu incelemeyi amaçladık. Sık olarak eksprese oldukları daha önceki çalışmalarda gösterilen miRNA'ları (Panel A) incelemeyi planladık. Örnekleri çalışırken kullanacağımız plate üzerindeki alan sayısı kısıtlı olduğundan hasta ve kontrol sayılarının az olması, yine bu nedenle çalışmaya aldığımız tüm tükürük bezi tümörü olgularının parotis kaynaklı bulunması dezavantaj olmuştur. Şu ana kadar miRNA'lar ile ilişkisi ortaya konulmamış birçok farklı hastalığın da serum miRNA ekspresyon düzeylerini değiştirebilme olasılığı olduğundan doku örneklerinde ekspresyon düzeylerinin çalışılması daha güvenilir sonuçlar verecektir. Doku örneklerini intraoperatif olarak sadece hasta grubundan aldığımızdan bu doku ile kıyaslanacak sağlıklı doku örneğinin olmayışı yine çalışmanın eksiklikleri arasındadır.

Çalışmamızda 8 miRNA'nın (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-30e-5p) plazmada istatistiksel olarak anlamlı oranlarda azaldığını gördük. Tükürükte ise pozitif veya negatif yönde istatistiksel açıdan anlamlı olan herhangi bir ekspresyon saptanmadı. Plazmada anlamlı olarak ekspresyonu azalan miRNA'lardan miR-146a-5p' nin plazmada hiç ekspresyonunun saptanmadığını, miR-126-3p' nin plazma ve dokuda saptandığını, ancak tükürükte görülmediğini, diğer 6 miRNA'nın ise hem plazma, hem tükürük, hem de dokuda eksprese olduğunu gördük(Şekil 6). Kontrol grubundan doku alınmaması nedeniyle doku için sadece hasta grubunun plazma ve tükürük örnekleriyle olan korelasyonundan bahsedebiliriz. Çalışmamızda tüm miRNA'ları göz önüne alacak olursak plazma ile tükürük arasında ve plazma ile doku arasında korelasyon olmadığını, ancak zayıfda olsa tükürük ile doku arasında bir korelasyon olduğunu gördük. Tükürük ve doku arasındaki korelasyonun varlığı bize bu tür çalışmalar için doku örneği yerine tükürük kullanılarak non invaziv şekilde miRNA analizi yapılabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konuda net yorum yapabilmek için bu yönde daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Literatür incelendiğinde ağız içi kanserli hastaların serumlarından yapılan çalışmalarda mir-16 ve let-7b seviyelerinin sağlıklı kontrollerden alınan serumlara göre ekspresyon seviyelerinde artış olduğu; mir-338-3p, mir-223 ve mir-29a seviyelerinin ise azaldığı gözlenmiştir.¹¹⁸ Mir-223-3p' nin serumda anlamlı olarak azalışını biz de çalışmamızda tespit ettik.

Sun ve ark.'larının Rac1 downregulasyonu yoluyla prostat kanserinde baskılayıcı bir rol oynadığını gösterdikleri mir-146a'nın¹¹⁹ bizim çalışmamızda da serumda azaldığı görülmüştür.

Literatürde üçlü-negatif meme kanseri örneklerinde, bir tümör supresör gen olan BRCA1 ve miR-146a ekspresyonu arasında güçlü bir pozitif korelasyon gösterilmiştir. Ayrıca miR-146a downregülasyonunun lenf nodu pozitifliği ile bağlantısı ve hastaların genel olarak azalmış sağkalımı ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir¹²⁰

Liu ve arkadaşları Adenoid Kistik Karsinom (Adenoid Cystic Carcinoma-ACC)'da miR-155 in aşırı ekspresyonunu, Mir-155' in inhibisyonunun ACC-2 hücrelerinin (ACC için model olarak kullanılmıştır) invazyon kapasitesini belirgin bir şekilde azalttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada mir-155 inhibisyonunun ayrıca EGFR ve RelA (NF-κB) ekspresyonlarında azalmaya yol açtığı saptanmıştır.¹²¹

Mitani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre miR-17 ve miR-20a aşırı ekspresyonunun ACC' de kötü survive sonuçları ile bağlantılı olduğu görülmüştür¹²²

Başka bir çalışmada ACC ile ilgili yapılan fonksiyonel analiz MiR-181a' nın tükürük bezi adenoid kistik kanserinde hücre göçünü, yayılmasını ve çoğalmasını inhibe ettiğini in vitro olarak; tümör gelişimi ile akciğer metastazını baskıladığını da in vivo olarak göstermiştir. MiR181a mimiğinin ACC hücrelerinde MAPK-Snai2 yolağını hedefleyerek adenoid kistik karsinom metastazını suprese ettiği saptanmıştır.¹²³

Bizim çalışmamızda ACC tanılı hasta olmamakla birlikte sözü geçen miRNA'ların (miR-155, miR-181a, miR-17,miR-20a) serumda veya tükürükte pozitif veya negatif yönde anlamlı ekspresyonunu görmedik.

Yaptığımız çalışmadan yola çıkarak daha fazla hastanın katılımı ve kontrollü doku çalışmalarıyla sonuçların güvenilirliğinin test edilmesi uygun olacaktır. Ayrıca riskli miRNA ekspresyonlarının olduğu bireylerin hastalık gelişimi yönünden uzun süreli takibi aradaki ilişkiyi net olarak ortaya koyabilecektir. Elde ettiğimiz sonuçlarla, hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile tükürük bezi tümörlerinde eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma niteliğinde olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Hasta ile kontrol grubu arasında yapılan belirli miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında; kontrol grubuna göre hastalarda şu sonuçlara ulaşılmıştır:

Plazmada bakılan mikroRNA'lardan 8 tanesinin (hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-30e-5p) kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p < 0.05$).

Hasta grubundan alınan tükürük örneklerinde istatistiksel olarak azalan veya artan miRNA ekspresyonu saptanmadı.

Doku örneklerindeki miRNA'ların hasta kan ve hasta tükürük örneklerindeki miRNA'lar ile aralarındaki korelasyona bakıldı. Çalışmamızda miRNA'ları ayrı ayrı incelediğimizde bazı miRNA'lar için doku-tükürük, bazıları için doku-kan, bazıları için ise kan-tükürük düzeylerinin korele olduğu görüldü. Ancak çalışmadaki ortalama korelasyon katsayıları bize tükürük-kan veya doku-kan düzeyleri arasında korelasyon olmadığı, yalnızca doku-tükürük arasında zayıf bir korelasyon olduğunu gösterdi.

Elde ettiğimiz bu sonuçlarla, hasta sayısının daha fazla olduğu çok merkezli çalışmalar ile tükürük bezi tümörlerinde eksprese olan, ekspresyonu azalan ya da artan miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile yeni tanı ve tedavi yaklaşımları geliştirilebileceğini, bu çalışmanın bir öncü çalışma olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Sun EC, Curtis R, Melbye M, Goedert JJ. Salivary gland cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:1095- 1100.
2. Muscat JE, Wynder EL. A case/control study of risk factors for major salivary gland cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;118:195-198.
3. Serfert G, Miehlike A, Haubrich J, Chilla R. *Diseases of the Salivary Glands. Pathology, Diagnosis, Treatment Facial Nerve Surgery* Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1986;24-26.
4. Martinez-Madrigal F, Micheau C. Major Salivary Glands. In Sternberg S. (ed):*Histology For Pathologists.* New York, Raven Press, 1992, pp:459-462.
5. Silvers AR. Som PM: Salivary glands In: Yousem DM(ed):*Head neck imaging RadiolClin North Am* 1998;36:941-966
6. Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy.* Third Edition. Williams and Wilkins. Baltimore, MD. 1992; 670–671, 751–2.
7. Kontis TC, Johns M. *Anatomy and Physiology of the Salivary Glands. Head and Neck Surgery-Otolaryngology,* Third Edition, ed. Byron J. Bailey. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA. 2001; 429–36.
8. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol* 1985;146: 51-58.
9. Rosai J: *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* Vol 2, 9th ed. Mosby. Edinburgh, London, New York, Oxford. 2004: 873-916.
10. Mendenhall WM, Rigds Jr. CE, Cassisi NJ. Treatment of Head and Neck Cancers. In De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. (eds):*Cancer. Principles and Practice of Oncology.* 7th ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Willins, 2005; 722.
11. Spiro RH: Salivary neoplasms. Overview of a 35-year experience with 2807 patients *Head Neck Surg* 1986; 8: 177-184.
12. Beyers RM, Jesse RH, Guillaumondegui OM, Luna MA. Malignant tumors of the submaxillary gland. *Am J Surg* 1973, 126:458-463
13. Gnepp DR, Schroeder W, Heffner D. Synchronous tumors arising in a single major salivary glands. *Cancer* 1989; 83: 1219-1224.

14. Luna MA, Tortoledo ME, Allen M. Salivary dermal analogue tumors arising in lymph nodes. *Cancer* 1987; 59: 1165-1169.
15. Smith A, Winkler B, Perzin KH, Wazen J, Blitzer A. Carcinoma arising in a mucoepidermoid carcinoma arising in an intraparotid lymph node. *Cancer* 1985; 55: 400-403.
16. Albeck H, Nielsen NH, Hansen H. Epidemiology of nasopharyngeal and salivary gland carcinoma in Greenland. *Arctic Med Res* 1992; 51: 189-195.
17. Shore-Freedman E, Abrahams C, Recant W, Schneider AB. Neurilemmomas and salivary gland tumors of the head and neck following childhood irradiation. *Cancer* 1983; 51: 2159-2163.
18. Spitz MR, Batsakis JG. Major salivary gland carcinoma. Descriptive epidemiology and survival of 498 patients. *Arch Otolaryngol* 1984; 110: 45-49.
19. Kaya S. Tükürük Bezi Hastalıkları. Güneş Tıp Kitabevi. Ankara. 1997
20. Eneroth C-M. Incidence and prognosis of salivary gland tumours at different sites. A study of parotid, submandibular and palatal tumours in 2632 patients. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1970; 263: 174-178.
21. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. IARC Press. Lyon. 2005.
22. Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. WHO International Histological Classification of Salivary Gland Tumors. *Pathol Res Pract* 1990; 186: 555-581.
23. Baker HW. Staging of head and neck cancer. *Semin Surg Oncol* 1992; 8: 73-77.
24. Frankenthaler RA, Luna MA, Lee S. Prognostic variables in parotid gland cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 1251-1256.
25. Gluckman J, Gullane P, Johnson J. Tükürük Bezleri, Bas-Boyun Tümörlerine Yaklaşım, Çev. Ed. Cevanşir B, Kıyak E. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 1995; 2: 17-32.
26. Suen J Y, Snyderman, N. L. Benign Neoplasms of the Salivary Glands, in *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, Cummings, C. W, Mosby Year Book. Philadelphia (2). 1992; 61: 1029-42.

27. Kaplan M, J. Johns, M. E. Malignant Neoplasms, in Otolaryngology Head and Neck Surgery, Cummings, C. W. Mosby Year Book, Philadelphia, (2): 1992; 62, 1043-78.
28. Frankenthaler RA, Luna MA, Lee S. Prognostic variables in parotid gland cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1991;117:1251-1256.
29. Fu KK, Leibel SA, Levine ML, Friedlander LM, Boles R, Phillip TL. Carcinoma of the major and minor salivary glands. Analysis of treatment results and sites and causes of failures. Cancer 1977;40:2882-2890.
30. Andersen LJ, Therkildsen MH, Ockelmann HH, Bentzen JD, Schiodt T, Hansen HS. Malignant epithelial tumors in the minor salivary glands, the submandibular gland, and the sublingual gland. Prognostic factors and treatment results. Cancer 1991;68:2431-2437.
31. Eneroth C-M, Hjertman L, Moberger G. Malignant tumours of submandibular gland. Acta Otolaryngol (Stockh) 1967, 64: 514-536
32. Waldron CA, el Mofty SK, Gneep DR. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1988 66: 323-333.
33. Keldahl MI, Zarif A, Gattuso P, Bilateral synchronous pleomorphic adenoma diagnosed by fine-needle aspiration. Diagn Cytopathol 2004; 30: 356-58.
34. Steele NP, Wening BM, Sessions RB. A case of pleomorphic adenoma of the parotid gland metastasizing to a mediastinal lymph node Am J otolaryngol 2007;28: 130-33.
35. Pitman MB, Thor AD, Goodman ML, et al. Benign pleomorphic adenoma of salivary gland: diagnosis of bone lesions by fine needle aspiration biopsy. Diagn Cytopathol 1992;8:384-87.
36. Saad RS, Takei H, Limpcomb J, et al. Nodular fasciitis of parotid region: a pitfall in the diagnosis of pleomorphic adenomas on fine needle aspiration cytology. Diagn Cytopathol 2005;33:191-94.
37. Domanski HA. Intravenous pyogenic granuloma mimicking pleomorphic adenoma in a fine needle aspirate. A case report. Acta Cytol 1999;43:439-41.

38. Cerulli G, Renzi G, Perugini M, et al. Differential diagnosis between adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma of the minor salivary glands of palate. *J Craniofac Surg* 2004;15:1056-60.
39. Mooney EE, Dodd LG, Layfield LJ. Squamous cell in fine needle aspiration biopsies of salivary gland lesion: potential pitfalls in cytologic diagnosis. *Diagn Cytopathol* 1996;15:447-52.
40. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, et al. *Pathology & Genetic: Head and Neck Tumours*, WHO Blue Book Series. Geneva: WHO;2005.
41. Bahar G, Dudkiewicz M, Feinmesser R, et al. Acute parotitis as a complication of fine needle aspiration in Warthin's tumors. A unique finding of a 3-year experience with parotid tumors aspiration. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:649-49.
42. Skalova A, Stareck I, Michal m, et al. Malignancy-simulating change in parotid gland oncocytoma following fine needle aspiration. Report of 3 cases. *Pathol Res Pract* 1999;195:399-405.
43. Klijanienko J, Vielh P. Fine needle sampling of salivary gland lesion II. Cytology and histology correlation of 71 cases of Warthin's tumor (adenolymphoma). *Diagn Cytopathol* 1997; 16:221-22.5.
44. Henke AC, Cooley ML, Hughes JH, et al: Fine-needle aspiration cytology of lymphangioma of the parotid gland in an adult. *Diagn Cytopathol* 2001; 24:126-128.
45. Raymond MR, Yoo JH, Heathcote JG, et al. Accuracy of fine-needle aspiration biopsy for Warthin's tumors. *J Otolaryngol* 2002;31: 263–70.
46. Verma K, Kapilla K. Salivary gland tumors with a p component. Cytologic finding and differential diagnosis of oncocytomas and Warthin's tumor on fine needle aspirates. *Acta Cytol* 2003;47: 221-26.
47. Parwani AV, Ali SZ. Diagnostic accuracy and pitfalls in fine-needle aspiration interpretation of Warthin tumor. *Cancer* 2003;99(3):166-71.
48. Goonewardene S A, Nasuti J F. Value of mucin detection in distinguishing mucoepidermoid carcinoma from Warthin's tumor on fine needle aspiration. *Acta Cytol* 2002;46: 704-8.

49. Chae SW, Sohn JH, Shin HS, Choi JJ, Kim YB. Unilateral, multicentric Warthin's tumor mimicking a tumor metastatic to a lymph node. A case report. *Acta Cytol* 2004;48: 229-33.
50. Wang MC, Tsai TL, Chen PC, et al. Extraparotit Warthin's tumor presented as a neck mass. *J Chin Med assoc* 2003; 66: 752-54.
51. Ballo MS, Shin HJ, Sneige N. Sources of diagnostic error in the fine-needle aspiration diagnosis of Warthin's tumor and clues to a correct diagnosis *Diagn Cytopathol*. 1997;17: 230-34.
52. Wacym PA, Gray GFJr, Rosenfeld L, et al Papiller cystic oncocytoma and Warthin's tumor of the parotid gland. *J Laryngol otol* 1986;100:679-86.
53. Ali SZ. Acinic-cell carcinoma, papillary-cystic variant: a diagnostic dilemma in salivary gland aspiration. *Diagn Cytopathol* 2002;27: 244-50.
54. Nigam S, Kumar N, Jain S. Cytomorphologic spectrum of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Acta Cytol* 2004;48: 309-14.
55. Ellis GL. Lymphoid lesions of salivary glands: Malignant and benign. *Med Oral Pathol Oral Cir Buccal* 2007;12:E479-85.
56. Voorhoeve PM & Agami R. Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta* 1775, 274-282, doi:S0304-419X(06)00064-3 [pii]10.1016/j.bbcan.2006.11.003 (2007).
57. Friedman RC, Farh KK, Burge CB & Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19, 92-105, doi:gr.082701.108 [pii]10.1101/gr.082701.108 (2009).
58. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-854.
59. Kozomara A & Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39, D152-157, doi:gkq1027 [pii] 10.1093/nar/gkq1027 (2011).
60. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36, D154-158, doi:gkm952 [pii]10.1093/nar/gkm952 (2008).

61. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A & Enright AJ miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*34, D140-144, doi:34/suppl_1/D140 [pii]10.1093/nar/gkj112 (2006).
62. Biasiolo M. et al. Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression. *PLoS One*6, e23854, doi:10.1371/journal.pone.0023854 PONE-D-11-09957 [pii] (2011).
63. Spizzo R, Nicoloso MS & Calin GA. MicroRNAs as new biomarkers in oncology. *Expert Opin Med Diagn*2, 115-127, doi:10.1517/17530059.2.2.115 (2008).
64. Lages E. et al. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci*17, 2508-2540, doi:4068 [pii] (2012).
65. Calin GA et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*101, 2999- 3004, doi:10.1073/pnas.03073231010307323101 [pii] (2004).
66. Wijnhoven BP, Michael MZ & Watson DI. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg* 94, 23-30, doi:10.1002/bjs.5673 (2007).
67. 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*113, 25-36, doi:S0092867403002319 [pii] (2003).
68. Cuellar TL & McManus MT. MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol*187, 327-332, doi:187/3/327 [pii]10.1677/joe.1.06426 (2005).
69. Chen CZ, Li L, Lodish HF & Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*303, 83-86, doi:10. 1126/ science. 10919031091903 [pii] (2004).
70. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*10, 704-714, doi:nrg2634 [pii]10.1038/nrg2634 (2009).
71. Gordanpour A, Nam RK, Sugar L. & Seth, A. MicroRNAs in prostate cancer: from biomarkers to molecularly-based therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis*15, 314-319, doi:pcan20123 [pii]10.1038/pcan.2012.3 (2012).
72. Goodfellow SJ, White RJ. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle* 2007;6:2323-2326.

73. Felton-Edkins ZA, Kenneth NS, Brown TR, et al. Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle* 2003;2:181-184.
74. Scott PH, Cairns CA, Sutcliffe JE, et al. Regulation of RNA polymerase III transcription during cell cycle entry. *J Biol Chem* 2001;276:1005-1014.
75. White RJ, Gottlieb TM, Downes CS, Jackson SP. Cell cycle regulation of RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 1995;15:6653-6662.
76. Costanzo G, Camier S, Carlucci P, et al. RNA polymerase III transcription complexes on chromosomal 5S rRNA genes in vivo: TFIIIB occupancy and promoter opening. *Mol Cell Biol* 2001;21:3166-3178.
77. Young LS, Rivier DH, Sprague KU. Sequences far downstream from the classical tRNA promoter elements bind RNA polymerase III transcription factors. *Mol Cell Biol* 1991;11:1382-1392.
78. Besser D, Gotz F, Schulze-Forster K, et al. DNA methylation inhibits transcription by RNA polymerase III of a tRNA gene, but not of a 5S rRNA gene. *FEBS Lett* 1990;269:358-362.
79. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Sci* 2004;303:83-86.
80. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1097-1101.
81. Hess J, Perez-Stable C, Wu GJ, et al. End-to-end transcription of an Alu family repeat. A new type of polymerase-III-dependent terminator and its evolutionary implication. *J Mol Biol* 1985;184:7-21.
82. Gu TJ, Yi X, Zhao XW, et al. Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics* 2009;10:563.
83. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RnaAPublication of the Rna Society* 2004;10:185-91.

84. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Sci* 2004;303:95-8.
85. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 2003;17:3011-6.
86. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nat* 2003;425:415-419.
87. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncol* 2010;4:230-41.
88. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (reprinted from *Cell*, vol 116, pg 281297, 2004). *Cell* 2007;131:1129.
89. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-269.
90. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 2002;21:5875-5885.
91. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, et al. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123:631-640.
92. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:369-378.
93. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005;11:1753-1761.
94. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy*, 2011;18:1104-1110.
95. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006;12:580-7.

96. Bhardwaj A, Singh S, Singh AP. MicroRNA-based Cancer Therapeutics: Big Hope from Small RNAs. *Mol Cell Pharmacol* 2010;2(5):213-9
97. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş H V. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011;38(1):113-20
98. Ramachandran S. & Palanisamy V. Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 286-293, doi:10.1002/wrna.115 (2012).
99. Weber JA. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56, 1733-1741, doi:clinchem.2010.147405 [pii]10.1373/clinchem.2010.147405 (2010).
100. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D. & Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38, 7248-7259, doi:gkq601 [pii]10.1093/nar/gkq601 (2010).
101. Zubakov D. et al. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* 124, 217-226, doi:10.1007/s00414-009-0402-3 (2010).
102. Chen X. et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18, 997-1006, doi:cr2008282 [pii]10.1038/cr.2008.282 (2008).
103. Lawrie CH. et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141, 672-675, doi:BJH7077 [pii]10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x (2008).
104. Bhardwaj A. Singh S, Singh AP. MicroRNA-based Cancer Therapeutics: Big hope from Small RNAs. *Mol Cell Pharmacol* 2010;2(5):213-9
105. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş H V. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011;38(1):113-20
106. McDermott AM, Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. The therapeutic potential of microRNAs; disease modulators and drug targets. *Pharm Res* 2011;28(12):3016-29.

107. John E DeBurgh Norman, Mark McGurk. Color Atlas and Text of the Salivary Glands, 1st ed, Barcelona, Mosby- Wolfe.
108. Seifert G. Histopathology of malignant salivary gland tumours. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1992, 28B; 49.
109. Seifert G, Sobin LH. The world health organization's histological classification of salivary gland tumours; a commentary on the second edition. *Cancer* 1992,70; 379.
110. Wang Z, Luo H, Pan X, Liao M. & Hou Y. A model for data analysis of microRNA expression in forensic body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet*6, 419-423, doi:S1872-4973(11)00181-5 [pii]10.1016/j.fsigen.2011.08.008 (2012).
111. Omelia EJ, Uchimoto ML & Williams G. Quantitative PCR analysis of blood- and saliva-specific microRNA markers following solid-phase DNA extraction. *Anal Biochem*435, 120-122, doi:S0003-2697(13)00014-6 [pii]10.1016/j.ab.2012.12.024 (2013).
112. Weber JA. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*56, 1733-1741, doi:clinchem.2010.147405 [pii]10.1373/clinchem. 2010.147405 (2010).
113. Park NJ. et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*15, 5473-5477, doi:1078-0432.CCR-09-0736 [pii]10.1158/1078-0432.CCR-09-0736 (2009).
114. Iorio MV & Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*27, 5848-5856, doi:JCO.2009.24.0317 [pii] 10.1200/JCO.2009.24.0317 (2009).
115. Baranwal S. & Alahari SK. miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *Int J Cancer*126, 1283-1290, doi:10.1002/ijc.25014 (2010).
116. Filipowicz W, Bhattacharyya SN & Sonenberg N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*9, 102-114, doi:nrg2290 [pii]10.1038/nrg2290 (2008).
117. Mitchell PS. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*105, 10513-10518, doi:0804549105 [pii]10.1073/pnas.0804549105 (2008).

118. Maclellan SA. et al. Differential expression of miRNAs in the serum of patients with high-risk oral lesions. *Cancer Med*1, 268-274, doi:10.1002/cam4.17 (2012).
119. Sun Q, Zhao X, Liu X, Wang Y, Huang J, Jiang B, Chen Q, Yu J. miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate* 2014 Dec;74(16):1613-21
120. Kumaraswamy E, Wendt KL, Augustine LA, Stecklein SR, Sibala EC, Li D, Gunewardena S, Jensen RA. BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene*. 2014 Nov 24. doi: 10.1038/onc.2014.363.
121. Liu L1, Hu Y, Fu J, Yang X, Zhang Z. MicroRNA155 in the growth and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2013 Feb;42(2):140-7
122. Mitani Y, Roberts DB, Fatani H, Weber RS, Kies MS, Lippman SM, El-Naggar AK. MicroRNA profiling of salivary adenoid cystic carcinoma: association of miR-17-92 upregulation with poor outcome. *PLoS One*. 2013 Jun 25;8(6):e66778.
123. He Q1, Zhou X, Li S, Jin Y, Chen Z, Chen D, Cai Y, Liu Z, Zhao T, Wang A. MicroRNA-181a suppresses salivary adenoid cystic carcinoma metastasis by targeting MAPK-Snai2 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov;1830(11):5258-66

KISALTMALAR LİSTESİ

miRNA :MikroRNA

mRNA: Mesajcı RNA

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TRBP: TAR RNA bağlayan protein

PACT: PZR aktive eden protein

RISC: RNA İndüklenmiş Baskılayıcı Kompleksi

UTR: Kodlanmayan Bölge

ORF: Açık okuma çerçevesi

ACC: Adenoid Kistik Karsinom

İİAS: İnce iğne aspirasyon sitolojisi

TABLolar DİZİNİ

TABLO		Sayfa No
Tablo 1	Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları	40
Tablo 2	Hasta ve kontrol gruplarındaki cinsiyet dağılımı	40
Tablo 3	Hasta ve kontrol grubundaki tümör tiplerinin dağılımı	41
Tablo 4	Hasta ve kontrol gruplarında serum miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması	42
Tablo 5	Hasta ve kontrol gruplarında tükürük örneklerindeki miRNA ekspresyonlarının karşılaştırılması	46
Tablo 6	Hasta grubunda plazma, doku ve tükürük örneklerindeki miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyonu gösteren tablo	50
Tablo 7	Hasta grubundaki tüm miRNA'lar için plazma-tükürük, plazma-doku ve tükürük-doku örnekleri arasındaki ortalama korelasyon katsayıları	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL		Sayfa No
Şekil 1	mikroRNA oluşumu	26
Şekil 2	mikroRNA oluşumu ve fonksiyonu	27
Şekil 3	Hasta grubunda plazmada azalma gösteren miRNA'ların fold regulation değerlerinin grafiksel ifadesi	45
Şekil 4	Hasta grubunda anlamlı olarak eksprese olan miRNA'ların ekspresyon oranlarının grafiksel ifadesi.	46
Şekil 5	Hasta grubunun tükürük örneklerinde artma veya azalma gösteren miRNA ekspresyon oranlarının grafiği	50
Şekil 6	Hasta grubunda doku, plazma ve tükürük örneklerinde ekspresyon varlığını gösteren venn şeması	52