



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HÜCRE DIŞI SİRKÜLER MOLEKÜLLERİN LARENKS KANSERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

BAŞAK YAVUZ

Tez Danışmanı

Doç Dr. Akın ÇAYIR

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE - 2019



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HÜCRE DIŞI SİRKÜLER MOLEKÜLLERİN LARENKS KANSERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan

BAŞAK YAVUZ

Tez Danışmanı

Doç Dr. Akın ÇAYIR

TIBBİ SİSTEM BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

ÇANAKKALE – 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum Adı : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri

Enstitüsü

Program Adı :

Programın Seviyesi :Yüksek Lisans () Doktora ()

Anabilim Dalı :

Tez Sahibi Adı ve Soyadı:

Tez Başlığı :

Sınav Yeri :

Sınav Tarihi :

Yukarıda tanıtımı yapılan tez, Tez Sınav Jürisi tarafından okunmuş, kapsam ve kalite yönünden başarılı bulunarak Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Sınav Jürisi

Danışman (Unvan ve Adı)	Kurumu	İmza
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan ve Adları)		

Tez sınav jürisi tarafından başarılı olarak kabul edilen Yüksek Lisans/Doktora Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

THESIS APPROVAL FORM

Institute Name : Çanakkale Onsekiz Mart University Institute of Health Sciences

Programme Name :

Programme Level : Master of Science () Doctor of Philosophy ()

Department :

Student Name and Surname: :

Title of the Thesis :

Examination Place :

Examination Date :

We have investigated the present thesis in regard to content and quality and have approved as a Master of Science / Doctor of Philosophy Thesis.

Supervisor (Title and Name)	Institution	Signature
Members of Examination Jury (Titles and Names)		

The above examination jury decision has been approved by Administrative Board of Health Science Institute, Canakkale Onsekiz Mart University, with decision dated and numbered

BEYAN FORMU

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi, Madde 8’de belirtilen ve ayrıntılı olarak tanımlanan etiğe aykırı eylemleri (intihal, sahtecilik, çarpıtma, tekrar yayım, dilimleme, haksız yazarlık ve diğer etik ihlali türleri) yapmadığımı onurumla beyan ederim.

Tarih:

Tez Sahibi Adı ve Soyadı: Başak YAVUZ

İmza:

TEŐEKKÖR SAYFASI

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgi ve desteğini benden esirgemeyen; Danışman Hocam Doç. Dr. Akın ÇAYIR'a katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca desteğini benden esirgemeyen Prof. Dr. Nihal KILINÇ hocama teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca desteğini esirgemeyen Biga Devlet Hastanesi idaresi ve eczane birimininde çalışan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doğduğum andan bugüne her zaman maddi ve manevi desteğini hissettiren ve yanımda olan çok sevgili annem Sevda YAVUZ'a, babam Muharrem Yetiş YAVUZ'a sevgisiyle beni güçlendiren kardeşim Burçak YAVUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
TEZ ONAY FORMU	ii
TEZ ONAY FORMU (İNGİLİZCE)	iii
BEYAN FORMU	iv
TEŞEKKÜRLER SAYFASI	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Larenks Kanseri	5
2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji	5
2.1.2. Larenks Kanserinin Etiyolojisi	5
2.1.2.1. Sigara Kullanımı	5
2.1.2.2. Alkol Kullanımı	6
2.1.2.3. Cinsiyet	6
2.1.2.4. Gastro özofageal Reflü	7
2.1.2.5. Viral Risk Faktörleri	7
2.1.2.6. Beslenme	7
2.1.2.7. Çevresel Faktörler	8
2.1.2.8. Radyasyon	8
2.1.3. Larenks Kanseri Patolojisi	8
2.1.4. Tanı ve Tedavi Yaklaşımları	9
2.1.4.1. Radyoterapi	11
2.1.4.2. Kemoterapi	11

2.1.5.Larenks Kanserinde Kullanılan Biyomarkerlar	11
2.1.5.1.Hücre Dışı Sirküler Nükleik Asitler	12
3.GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1.Araştırma Türü	20
3.2. Veri Toplama	20
3.3. Etik	20
3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları	21
3.5. Kan Örneklerinin Alınması ve Deneysel Sürece Hazırlanması	21
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	21
3.7.İstatistiksel Analiz	22
3.6. Verilerin Değerlendirilmesi	21
3.6.1. Kan Plazmasında ccfDNA Miktar Tayini	21
3.6.2. Kan Plazmasında ccfmiRNA Miktar Tayini	22
3.6.3. Kan Plazmasında RNA Miktar Tayini	22
3.6.4. İstatistiksel Analiz	22
4.BULGULAR	23
5. TARTIŞMA	34
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	40
6.1.Sonuç	40
6.2.Öneri	41
7.KAYNAKLAR	43
EKLER	
Ek-1. Etik Kurul Karar Formu	52
Ek-2. Spiralli Tez Kontrol Formu	53
Ek-3. Spiralli/Ciltli Tez Yazım Kontrol Listesi	54
Ek-4. Özgeçmiş	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma /Simge	Açıklaması
Bcl-2	B-cell lymphoma gene-2
BT	Bilgisayarlı tomografi
ccfDNA	Serbest sirküler DNA
ccfmiRNA	Serbest sirküler mikro RNA
ccfRNA	Serbest sirküler RNA
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
E6	Erken protein 6
E7	Erken protein 7
G	Gram
Hpv	Human papilloma virus
Hpv-16	Human papilloma virus tip 16
Hpv-18	Human papilloma virus tip 18
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	Mikro RNA
ml	Mililitre
MR	Manyetik rezonans
ng/µl	Nanogram/mikrolitre
ng/ml	Nanogram/mililitre
P	Olasılık değeri
piRNA	Piwi etkileşimli RNA
R	Korelasyon katsayısı
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
rRNA	Ribozomal RNA
snoRNA	Küçük nükleer RNA'lar

snRNA	K küçük nüklear RNA'lar
SS	Standart sapma
T1	Tiroid kanseri evre 1
T2	Tiroid kanseri evre 2
T3	Tiroid kanseri evre 3
T4	Tiroid kanseri evre 4
tRNA	Taşıyıcı RNA
UV	Ultraviyole



TABLO LİSTESİ

	Sayfa sayısı
Tablo 1. Larenks kanserli bireyler ile kontrol grubuna ait karakteristik veriler	23
Tablo 2. Kanserli ve kontrol grubundan elde edilen ccfDNA miktarları (ng/ μ l)	24
Tablo 3. Kanserli ve kontrol grubundan elde edilen ccfRNA miktarları	25
Tablo 4. Kanserli ve kontrol grubundan elde edilen ccfmiRNA miktarları	26
Tablo 5. ccfDNA miktarının cinsiyete göre dağılımı	27
Tablo 6. ccfRNA miktarının cinsiyete göre dağılımı	28
Tablo 7. ccfmiRNA miktarının cinsiyete göre dağılımı	28
Tablo 8. Sigara kullanımı bakımında ccf DNA miktar dağılımları	29
Tablo 9. Sigara kullanımı bakımında ccfRNA miktar dağılımları	30
Tablo 10. Sigara kullanımı bakımında ccfmiRNA miktar dağılımları	31
Tablo 11. Larenks kanserli bireylerde elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki korelasyon katsayıları.	32
Tablo 12. Sağlıklı bireylerde elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki korelasyon katsayıları	33

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa Sayısı
Şekil.1 MicroRNA çalışma düzeni (Baccarelli ve Bollati 2009)	18
Şekil 2. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfDNA miktar dağılımları	24
Şekil 3. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfRNA miktar dağılımları	25
Şekil 4. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfmiRNA miktar dağılımları	26
Şekil 5. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfDNA miktar cinsiyete göre dağılımları	27
Şekil 6. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfRNA miktar cinsiyete göre dağılımları	28
Şekil 7. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfmiRNA miktar cinsiyete göre dağılımları	29
Şekil 8. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfDNA miktar sigara kullanımına göre dağılımları	30
Şekil 9. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfRNA miktar sigara kullanımına göre dağılımları	31
Şekil 10. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfmiRNA miktar sigara kullanımına göre dağılımları	32

ÖZET

Kanser hastalığı insidansı yüksek bir hastalıktır. Tedavisi kesin olmamakla birlikte maliyetlidir. Hastalık ne kadar erken teşhis edilirse başarı da o ölçüde artmaktadır. Larenks kanseri de insidansı giderek artan bir baş ve boyun kanseri çeşididir. Sigara kullanımı, sağlıksız beslenme gibi çevresel faktörlerle birlikte cinsiyet, yaş ve kalıtım da önemli etkenlerdir. Erkeklerde görülme oranı kadınlarda görülme oranına göre oldukça fazladır. Baş ve boyun kanserlerinin teşhis ve tedavisi oldukça kısıtlı ve eski yöntemlerle yapılmaktadır. Hastalık ilerledikten sonra teşhis edilebilmekte ve bu da tedavinin etkinliğini azaltmaktadır. Biyomarkerlar doğrudan veya dolaylı olarak hastalıktan etkilenen böylece hastalığın varlığını ve ciddiyetini ortaya koyan kolayca ölçülebilen moleküllerdir. Hücre dışı sirküler DNA (ccfDNA), ccfRNA ve ccfmiRNA sağlıklı bireylerde ölçülebilen moleküllerdir. Diğer taraftan, hastalık durumlarında, hücre dışı sirküler nükleik asitlerin miktarsal olarak değiştiği bilinmektedir. Bundan dolayı, çalışmanın temel amacı, alınan kan örneklerinden ayrılan plazma örneklerinde hücre dışı nükleik asit miktarlarını belirlemek, bu miktarların sağlıklı olan bireylerden farklı olup olmadığını ölçmektir. Bu çalışmada, daha önce tanı ve tedavisi gerçekleşmiş 46 larenks karsinomlu olgu ve 46 kontrol grubu olmak üzere toplam 92 birey değerlendirilmiştir. Tüm hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin periferik kan örnekleri alınmıştır. Tam kan örnekleri kan ve plazmaya ayrılıp uygun koşullarda (-80 derece) saklanmıştır. Plazmada yer alan serbest moleküller Qubit 2.0 cihazı kullanılarak fluorometrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen bu değerler Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Popülasyonlara ait diğer faktörlerin etkilerini görmek için çoklu regresyon analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre ccfmiRNA ve ccfRNA larenks kanseri için biyomarker olma potansiyeli taşımaktadır. ccfDNA miktarının her iki grupta istatistiksel olarak farklı olmadığı tespi edilmiştir. (Anahtar sözcükler; larenks kanseri, biyomarker, ccfmiRNA, ccfRNA, ccfDNA).

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CIRCULATING CELL FREE MOLECULES IN LARYNGEAL CANCER

Cancer is a disease with a high incidence. Its treatment is not definite but costly. The earlier the disease is diagnosed, the greater the success is. Laryngeal cancer is a type of head and neck cancer with an increasing incidence rate. In addition to environmental factors such as smoking and unhealthy nutrition; gender, age, and heredity are also important factors. The incidence of of this cancer for men is considerably higher compared to women. Diagnosis and treatment of head and neck cancers have been conducted using very limited and old methods. It can be diagnosed after the disease has progressed, which reduces the effectiveness of the treatment. Biomarkers are the molecules that are directly or indirectly affected by the disease so that they can easily be measured to reveal the presence and severity of the disease. Circulating cell free DNA (ccfDNA), ccfRNA and ccfmiRNA are measured in healthy individuals. On the other hand, extracellular circular nucleic acids are known to vary quantitatively in disease states. Thus, the main purpose of the study was to determine the extracellular nucleic acid levels in plasma samples separated from the blood samples and to determine whether these amounts were different from the values of healthy individuals. In this study, a total of 92 individuals, 46 patients with laryngeal carcinoma and 46 controls, who were previously diagnosed and treated, were evaluated. Peripheral blood samples were obtained from all the patients and the control subjects. Whole blood samples were separated into blood and plasma and stored under appropriate conditions (-80 °C). The free molecules in the plasma were measured fluorometrically using the Qubit 2.0 instrument. Obtained data were compared with Mann Whitney U test. Multiple regression analysis was performed to obtain the effects of several factors of populations.

According to the results, ccfmiRNA and ccfRNA have the potential to be used as biomarkers of laryngeal cancer. The amount of ccfDNA is not statistically different in both groups. (Key Words; laryngeal cancer, biomarker, ccfRNA, ccfDNA, ccfmiRNA)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser hastalığı günümüzde oldukça sık görülen bir hastalıktır. Ekonomik açıdan gelişmişlik durumuna bağlı olmaksızın az ve çok gelişmiş tüm ülkelerde ölüm sebepleri arasında üst sıralarda yer almaktadır. Özellikle sigara kullanımı, yetersiz beslenme, yetersiz fiziksel aktivite gibi çevresel etmenler kanser riskini arttıran faktörlerdir. İstatistiklere göre, 2008 yılında dünya genelinde 12,7 milyon kanser vakasının görüldüğü ve 7,6 milyon kişinin kanser nedeniyle öldüğü bildirilmiştir. Global Kanser Gözleme (GLOBACAN) verileri esas alınarak yapılan tahminlerde, 2012 yılında 14,1 milyon yeni kanser vakasının meydana geldiği ve 8,2 milyon kişinin kanser nedeni ile öldüğü bildirilmiştir (Torre ve ark., 2015). Yapılan değerlendirmelerde 2020 yılına kadar her yıl 16 milyon yeni vakanın görüleceği öngörülmektedir (IARC 2011).

Baş ve boyun kanserleri, ağız boşluğu, farenks, kulak-burun ve larenkste oluşan malignansilerden oluşmaktadır (Attar ve ark., 2010). Her yıl yaklaşık olarak 560.000 yeni vaka görülmekte ve 300.000 birey baş ve boyun kanserlerinden ölmektedir (Boyle ve Levin 2008). Larenks kanseri, baş ve boyun kanserleri arasında en yüksek sıklığa sahip kanserlerdendir. Son 10 yılda, larenks kanseri insidansının arttığı ve bir yılda yeni teşhis edilen tüm malignitelerin %2-5'ini oluşturduğu saptanmıştır. Larenks kanseri, erkeklerde % 1,6, kadınlarda % 0,4 oranında görülmektedir (Boring ve ark.; 1993, Kaya 2002). Alkol ve sigara kullanımı larenks kanserinin bilinen en önemli nedenleri olarak kabul görmektedir (Blot ve ark., 1988). Elde edilen veriler, tütün ve alkol kullanımının larenks kanserine yakalanma riskini sinerjistik olarak arttırdığını ortaya koymuştur (Brugere ve ark., 1986; Curado ve Hashibe 2009). Bunun dışında, cinsiyet, yaş, kalıtım gibi bireysel faktörlerin de larenks kanserine yakalanma riskini arttıran faktörler arasında yer aldığı kabul görmektedir. Larenks kanserinin nedenleriyle ilgili her ne kadar yeterli bilgiye sahip olsak da teşhis ve tedavisiyle ilgili hala eski yöntemler kullanılmaktadır.

Baş ve boyun kanserlerinin tanı ve tedavi süreçleri hala başarılı bir şekilde yapılamamaktadır. Hastalıkla ilgili tanı; temel olarak klinik muayene ve radyolojik testler ile sınırlıdır. Bu durum, bireyde var olan hastalığın teşhis edilmesinde gecikmelere sebep olmaktadır. Bu süreç, hastalığı ancak ilerledikten sonra teşhis edilmesine neden olmaktadır. Dolayısı ile tedavinin olumlu sonuçlanması da riske

girmektedir. Sonuç olarak, şu ana kadar baş ve boyun kanserlerinin teşhis ve tedavisine yönelik önemli gelişmeler olmamıştır. Bu bağlamda, baş ve boyun kanserlerinin erken teşhisi, hastaların sağlıklarını yeniden geri kazanmaları için önemli bir adımdır.

Kanserin teşhis edilmesindeki zorlu süreç, hastalığı erken teşhis eden yeni tarama yöntemlerinin geliştirilmesiyle giderilmeye çalışılmaktadır. Özellikle ince iğne aspirasyon biyopsisi farklı hüresel kaynaklı molekülleri içermeleri nedeni ile bu bağlamda potansiyel özellikte olup önem arz etmektedirler. Örneğin, sıvı biyopsiler çok daha az invaziv ve potansiyel olarak çok daha ucuz olanaklar sunmaktadırlar. Günümüzde, sıvı biyopsilerdeki moleküllerin incelenmesiyle erken teşhis, hastalık taraması, tedavi ve terapinin planlanması, hastalığın takibi ve yeniden ortaya çıkması gibi süreçlerde kullanılabilen biyomarkerların (biyobelirteç) keşfedilmesi hedeflenmektedir.

Biyomarkerlar doğrudan veya dolaylı olarak hastalıklar hakkında yeterli veriyi ortaya koyan, kolay bir şekilde ölçülebilen hüresel, biyokimyasal veya moleküler değişimlerdir. Omik teknolojisi, moleküler değişimler ve hastalıklar arasındaki ilişkileri potansiyel olarak ortaya koyan ve dolayısı ile ilgili alana doğrudan uygulanabilen, yüksek doğrulukla biyolojik moleküllerin incelendiği bir teknolojidir. Bu teknoloji kapsamında, sirküler kanda dolaşan hücre dışı moleküller, bazı hastalıklar için yeni biyomarker olabilecek potansiyele sahiptirler. Son yıllarda kan gibi sıvı ortamlarda hücre dışına çıkmış bazı moleküllerin miktarsal olarak her bireyde farklı olabileceği belirtilmiştir. Bu bağlamda, bazı nükleik asitler önem kazanmıştır. Bunlar, hücre dışına çıkmış ve sıvı ortamlarda serbest halde bulunan DNA ve farklı RNA türleridir. Bu moleküller, kan plazması, kan serumu, idrar, gözyaşı, sinoviyal sıvı gibi ortamlarda ölçülebilir miktarda bulunabilmektedirler.

Hücre dışı sirküler DNA (ccfDNA) uzun zamandır bilinen ancak son yıllarda araştırılmaya başlanan bir hücre materyalidir. Sağlıklı bireylerde ccfDNA'nın karakterize bir boyutunun olduğunun bulunmuştur (Jahr ve ark., 2001). Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalarda serbest dolaşan DNA'nın hasta bireylerde ve metastaz durumunda sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kanser hastalarında, ccfDNA'nın ilgili tümör DNA'sına benzer genetik ve epigenetik özellik taşıdığı için ccfDNA'nın tümöral dokudan kaynaklandığına dair kanıtlar

bulunmaktadır (Kohler ve ark., 2011). Birçok çalışma, ccfDNA'nın genellikle apoptotik ve nekrotik süreçler ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

DNA'nın hücrede serbest hale geçmesine neden olan mekanizmaların, RNA'nın da serbest hale geçmesine neden olduğu kabul edilmektedir. Bu bağlamda, hücre dışı sirküler RNA'lar (ccfRNA), çeşitli sıvılarda bulunabilen ve ölçülebilecek kadar olabilen moleküllerdir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda ccfRNA'nın, şeker hastalığı, travma, inme ve miyokard enfarktüsü gibi hastalıkların nedenlerinin araştırılmasında kullanıldığı görülmektedir (Swaminathan ve Butt 2006). Diğer taraftan, idrar, kan ve diğer vücut sıvılarından elde edilen ccfRNA miktarı ile kanser arasında ilişki tespit edilmiş ve kanser hastalarının plazmasındaki tümör kaynaklı RNA'ların varlığı tespit edilmiştir.

MikroRNA'lar (miRNA) kodlama yapmayan küçük RNA'lardır. Ortalama 22 nukleotitten oluşmuş bir uzunluğa sahiptirler. MiRNA'lar DNA'dan transkribe edildikten sonra, çeşitli aşamalardan geçip işlevsel hale gelmektedirler. MiRNA'lar, çoğunlukla, hedef mRNAların 3'UTR (kodlama yapmayan bölge) bölgeleri ile etkileşime geçerek gen anlatımını baskılamaktadırlar (Chalfie ve ark., 1981). Ancak, 5'UTR, kodlama yapan bölgeler, genlerin promotor bölgeleri ile etkileşime girip gen anlatımını düzenleyen miRNA'ların varlığı da gösterilmiştir (Broughton ve ark., 2016). Bazı koşullarda, miRNA'ların gen anlatımını aktive ettiği de gösterilmiştir (Vasudevan, 2012). Yapılan çalışmalar, üretildikten sonra, miRNA'ların hücre içerisinde hareketli olduklarını ve farklı yerlere ulaşarak fonksiyonel olduklarını, böylelikle translasyon oranı ve hatta transkripsiyonu kontrol ettiklerini göstermiştir. miRNA'lar, gelişim için gerekli moleküllerdir. Ayrıca, farklı biyolojik süreçlerde rol almaktadırlar (Fu ve ark., 2013). MiRNA'ların aşırı şekilde üretilmesi birçok insan hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (Tüfekci ve ark., 2014; Paul ve ark., 2018). Hücre içerisinde bulunmalarının yanında, hücre dışına da çıktıkları bilinmektedir. Bu anlamda, sirküler serbest mikro RNA'ların (ccfmiRNA) yaygın bir şekilde birçok insan hastalığının belirteci olabileceği bildirilmiştir (Hayes ve ark., 2014; Wang ve ark., 2016).

Larenks kanserli hastalarda kan plazmasındaki hücre dışı moleküllerin miktarı ve ne ifade ettiği konusunda yapılan çalışmalar yeterli değildir. Böyle bir çalışma larenks kanseri hastalarında durumun ne olduğunu ortaya koymak, önerilen

moleküllerin daha sonraki çalışmalar için önemli bir yapı olduğunu ortaya koymak bu hastalarda teşhisin ve tedavinin yönlendirilmesinde önemli katkı sağlayacaktır. Bu nedenle tez çalışmasında, larenks kanserli hastalardan elde edilen plazma örneklerinden ccfDNA, ccfRNA ve ccfmiRNA miktarlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması, bu moleküllerin larenks kanserli bireyler ile sağlıklı bireyler arasında farklı olup olmadığı ve dolayısı ile birer biyomarker olup olmadığı araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Larenks Kanseri

2.1.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Larenks kanserleri; tüm baş boyun malignitelerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Curran ve ark., 1999). Görülme sıklığı 5. dekatattan sonra yükselişe geçmekte, 7. ve 8. dekatlarda pik yapmaktadır. 1990'lı yılların verilerine göre en yüksek insidans yılda 17,1/10.000 ile İspanya'da saptanmış olup Fransa, İtalya, Brezilya, Uruguay 10/ 10.0000'in üzerinde insidans ile diğer sık görülen ülkelerdir. Çin, Afrika ülkeleri, doğu Asya, Avustralya, Yeni Zelanda, Norveç ve İsveç'te insidansın 3/10.0000' in altında olduğu tespit edilmiştir. Ülkelere göre değişmekle birlikte erkek ve kadın nüfus arasındaki insidans oranı, 4:1 ile 30:1 arasındadır. Son yıllarda kadınlarda görülme sıklığı giderek artmaktadır. 30 yaş altında görülme sıklığı ise %1 olarak bildirilmiştir (Lipkin ve ark., 1985).

Ülkemiz verilerine göre sağlık bakanlığının 2017 yılında yayınladığı çalışmada erkeklerde görülen kanser türleri arasında %2,2 ile 8. sırada bulunmaktadır. Kadınlarda ise en yüksek 10 insidanslı kanser türü arasında yer almamaktadır. Bu oran ABD'de yaklaşık %1'dir. Aradaki belirgin farkın ülkemizde kullanımı halen oldukça yaygın olan tütün ürünlerine bağlı olduğu tahmin edilmektedir.

2.1.2. Larenks Kanserinin Etiyolojisi

Larenks kanseri multifaktöriyel bir hastalıktır. Larenks kanseri genetik faktörlerin etkisiyle birlikte dış etmenlerin de etkili olduğu bir kanser türüdür. Larenks kanserinin birçok nedeni olduğu düşünülse de bilinen en önemli nedenleri sigara ve alkol kullanımınıdır. Asbest, çimento tozu, vernik gibi bazı mesleki nedenlerle maruz kalınan kimyasallar da larenks kanseriyle ilişkilendirilmiştir. Düşük eğitim düzeyi, papilloma virüs enfeksiyonu ve gastroözofageal reflü bazı çalışmalara göre kofaktörlerdir.

2.1.2.1. Sigara Kullanımı

Sigara, larenks ve skuamöz hücreli baş boyun kanserlerinin çoğunda kanserojen etkisiyle bilinen en etkili risk faktörüdür (Kahn 1966; Falk ve ark., 1989). Tütün, özellikle supraglottik ve glottik larenks kanserleri için bir risk faktörüdür. Tütün kullananlarda %13,2 ile larenks kanseri riski belirtilmiştir (Wünsch, 2004). Sigaranın özellikle ağız içi kanserleri olmak üzere yemek borusu ve gırtlak kanseri üzerinde

etkisi vardır. Larenks kanserli hastaların öyküleri incelendiğinde %95 oranında sigara kullanımı görülmüştür (Kahn 1966; Falk ve ark., 1989). Araştırmalar, tütünde kansere neden olan primer maddenin nikotin olmadığını, aromatik heterosiklik radikaller ve epoksitler gibi çok sayıda başka karsinojenler olduğunu ortaya koymuştur. Bu maddeleri detoksifiye eden enzimleri kodlayan genlerin polimorfizmi, sigaranın kanser yapıcı etkisinden sorumlu tutulmaktadır (To-Figueras ve ark., 2002).

Kanser hastalarının sigarayı bıraktıktan sonraki iyileşme süreçleri incelendiğinde sigarayı bırakan ve kullanmaya devam eden hastalar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tomek ve McGuirt, 2003). Bu çalışma, sigara kullanımının kümülatif bir hasara neden olduğunu ve düzelemeyeceğini göstermektedir. Ancak yaşlılar üzerinde yapılan bir başka çalışmada da sigarayı bıraktıktan yaklaşık 10 yıl sonra bu etkinin azaldığı yönünde bulgular vardır (Franceschi ve ark., 1990).

2.1.2.2. Alkol Kullanımı

Alkol özellikle supraglottik kanserler için bir risk faktörü olup tütünde olduğu kadar kesin olmamakla birlikte doza bağlı olarak riski artırır (Dosemeci ve ark., 1997). Baş boyun kanserleri için değişik derecelerde tüketim miktarlarına göre risk oranının 1,4-5,9 arasında değiştiği bildirilmiştir. Kullanılan alkolün çeşidinin riski etkilemediği belirtilmiştir (Menvielle ve ark., 2004). Alkol, larenks kanseri için kanser gelişimi açısından sigaradan bağımsız bir risk faktörüdür. Ancak kombine alkol ve tütün kullanımının kanser riskini belirgin ölçüde artırdığı gösterilmiştir.

2.1.2.3. Cinsiyet

Türkiye ve dünyada yapılan çalışmalara göre larenks kanserinin kadınlarda görülme sıklığı erkeklerde görülme sıklığına oranla oldukça azdır. Ancak bu fark giderek azalmaktadır. Nedeni de kadınların iş ve sosyal hayatta daha fazla yer almasıyla toksik maddelere maruziyetlerinin artmış olmasıdır. Aynı zamanda kadınların alkol ve özellikle tütün ürünlerini tüketimlerinin de artmış olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Gallus ve ark., 2003). Tanı ve tedavi esnasında da cinsiyete göre farklar bulunmaktadır. Erkeklerin kadınlara göre kanserin daha ileri evresinde hastaneye başvurdukları yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Haydaroglu ve ark., 2007).

2.1.2.4. Gastro özofageal Reflü

Mide içerisindeki asitli içeriğin yemek borusuna doğru ters yönde hareketine gastroözofageal reflü denmektedir. Reflü sırasında hücreler midenin asitli içeriğine maruz kalmaktadır. Bu da hücreler için tahriş edici olup zararlıdır. Larenks kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda sigara içmeyen hastaların reflü sorunu yaşadığı tespit edilmiştir. Bu durum gastroözofajial reflünün larenks kanserinin nedenlerinden biri olabileceğini düşündürmektedir (Dağlı ve ark., 2004).

2.1.2.5. Viral Risk Faktörleri

Herpes simplex enfeksiyonu ile larenks lökoplakileri ve kanseri arasında ilişki olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Du ve ark., 2004). Larenks kanserlerinde HPV pozitifliği % 3 ile % 85 arasında değişmektedir (Major ve ark., 2005). HPV 16'nın daha az miktarda HPV 18'in kanserin etiyolojisinde yer aldığı düşünülmektedir. Apoptotik moleküllerin Bak ve Bcl-2'nin HPV 16 E6 ve E7 tarafından düzensizleştirilmesinin, daha sonra insan larenks kanseri gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (Du ve ark., 2004). HPV'nin larenks kanseri üzerinde etkisinin sigara ve alkolle birlikte artmış bir risk etmeni olduğu gözlenmiştir (Smith ve ark., 2000). Ancak kesin bir sonuç için henüz bulgular yeterli değildir (Syrjänen 2005).

2.1.2.6. Beslenme

Larenks kanserinin beslenme ile de oldukça yakın ilişkisi vardır. Lifli besinlerce zengin diyetle kanser riskinin azaldığı çalışmalarda gösterilmiştir. Sebze ve meyve ağırlıklı, bitkisel yağlarla zengin doymamış yağ asidi yüksek 'Akdeniz tipi' diyet olarak adlandırılan diyetle beslenenlerde larenks kanseri riskinin daha az olduğu gözlenmiştir (La Vecchia ve ark., 2001). Bitkisel yağ ve balık tüketiminin ve orta derecede yüksek çoklu doymamış / doymuş yağ asidi oranının da kanser riskini azalttığı gözlenmiştir (Estève ve ark., 1996). Lifli gıda tüketiminin de olumlu bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca arıtılmış tahılların tüketimi, larenks kanseri riski ile pozitif ilişkili bulunurken, doğal haldeki tahıl ürünlerinin tüketimi ile larenks kanseri riski arasında ters orantı olduğu bildirilmiştir. Yetersiz ve dengesiz beslenenlerde larenks kanseri insidansının arttığı savunulmaktadır. Taze meyve ve sebze tüketiminin azalmasıyla düşük beta-karoten, C vitamini ve E vitamini alımının da kanser üzerinde olumsuz etkisi olduğu düşünülmektedir. Selenyumun larenks

kanserinde koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Lajtman ve ark., 1994, Est ève ve ark., 1996).

2.1.2.7. Çevresel Faktörler

Larenks kanseri mesleki ve çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Larenks kanserli popülasyonlar, genellikle farklı toksik maddelere maruz kalan bireylerden oluşmaktadır. Örneğin, polisiklik aromatik bileşiklere, toksik metal maruziyeti, asbest gibi karsinojenik maddelere maruz kalan bireylerde larenks kanseri daha fazla görülmektedir. 1970'lerden beri özellikle asbestin larenks kanseri ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Asbeste maruz kalma sonucu, riskin 1,8 ile 9 kat arttığını gösteren çalışmalar vardır (Du ve ark., 2004). Pestisitlerin kullanımı ile kanser insidansı arasında bir korelasyon saptanmıştır. Mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkili pestisitlerin neden olduğu etkiler geçmişte yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Bolognesi ve Morasso, 2000). Mutajenik etkiye sahip pestisitler (diazinon, ziram v.b) kromozomal kırılmalara neden olurlar.

2.1.2.8. Radyasyon

İyonize radyasyonun larenks kanseri için bir risk faktörü olduğu öne sürülmüştür. Radyasyonun karsinojenik etkisi doz, fraksiyon ve dağılım oranına bağlıdır. Larenks kanserinde, radyoterapiden yıllar sonra oluşan tümörlerin, rekürren tümör değil radyasyona bağlı olarak oluşan ikinci primer tümörler olduğu savunulmaktadır (Gao ve ark., 2003).

2.1.3. Larenks Kanseri Patolojisi

Baş ve boyun kanserlerinin %90'ı skuamöz hücreli karsinomdur (Curado ve Hashibe, 2009). Yassı epitel hücreli karsinomların tüm larenks malign tümörlerine oranı yaklaşık %95-98'dir. Bu karsinomlarda spindle cell karsinoma, verrüköz karsinoma gibi türler de vardır (Koç 2013).

İnterselüler köprüler bulunan, keratin oluşumu ile karakterize olan yassı epitel hücreli karsinom, skuamöz diferansiyasyon gösteren bazal membranı invaze eden bir malign epitelyal tümördür. Tümör dokularını derecelendirirken hücrelerin pleomorfizm ve mitotik aktivitelere bakılmaktadır. Tümörün gradelemesi; iyi, orta, ve kötü diferansiye olmak üzere üç gruptan oluşur. Gradelemede hücresel pleomorfizm ve mitotik aktivite esas alınır.

Larenks kanserleri buldukları bölgeye göre de 4 gruba ayrılır. Bu 4 grup; supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik kanserlerdir. Larenks karsinomlarının çoğu supraglottik ve glottik bölgede gözlenip, iyi ve orta derece diferansiyede oldukları tespit edilmiştir. Larenks kanseri bu orana göre; %60-65'i glottik bölgede, % 30-35' i supraglottik bölgede, % 5'den azı transglottik bölgede ve % 5'den azı subglottik bölgede gözlenmektedir (Cırık, 2009). Subglottik bölgedeki karsinomlar ise orta veya kötü diferansiyedir (Rosai, 2004).

Supraglottik bölgedeki tümörlerin, bu bölge lenf damarları yönünden zengin olduğu için, lenf dolaşımına da yayılımları kolaydır. Hasta uzun süre boğaz ağrısından yakınabilir ve kronik farenjit sanılabilir. Bu bölgedeki kanserler ileri evrede teşhis edildiğinden bu durum göz önünde bulundurulmalıdır (Myers ve Alvi, 1996). Bu türde lenf nodu metastazı görülmektedir.

Glottik kanserler; en sık glottisin 1/3 ön kısmında görülürler. Lenf dokusu az olan bu bölgede uzun süre yayılmadan kalabilen kanserlerdir. Ancak öne veya arkaya doğru yayılıp ve vokal kasa geçebilirler. Genellikle erken evrede fark edilebilir kanser türleridir.

Subglottik kanser; vokal kordlarda etkisini gösteren kanserlerdir. Krikoid ve tiroid kıkırdağa yayılma gözlenmektedir.

Transglottik kanserler; transglottik kanserler diğer kanser türlerine oranla daha az görülür. Tüm kanserlerin % 5'inden azını oluşturur. Bir bölgeden diğerine geçen kanserlerdir.

2.1.4. Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Anamnez, fiziki muayene, radyolojik inceleme, endoskopik muayene ile larenks kanseri tanısı koyulmaktadır. Sık rastlanan semptomlar arasında ses kısıklığı, boğaz ağrısı, disfaji, odinofaji yer alır. Ancak bu semptomlar larenks kanserinin türüne göre değişiklik göstermektedir. Glottik kanserlerde ses kısıklığı erken belirti olarak ortaya çıkmakta, ancak subglottik ve supraglottik kanserli vakalarda daha geç ortaya çıkar. Boğaz ağrısı semptomu ve disfaji ise supraglottik bölge kanserlerinde erken gözlenen belirtilerdendir. Hemoptizi ve kulak ağrısı semptomları ise diğerlerine göre daha nadir gözlenmektedir. Hava yolunu tıkayan büyük kitlelerde ise dispne semptom olarak görülmektedir. Supraglottik kanserlerde ise boyun metastazları oldukça sık görülen bulgulardır. Larenks muayenesine lezyonun yeri, hangi bölgelere uzandığı ve

vokal kord hareketleri hakkında gerekli bilgi veren indirekt larengoskopi ile başlanmalıdır. Palpasyon özellikle larenks dışına taşmış tümörlerde değerlidir. Gerekli görülürse bilgisayarlı tomografiden (BT) de yararlanılır. Bu yöntem tümörün büyüklüğünü, uzanımı, bölgedeki kıkırdağın durumunu ve muayene sırasında görülemeyen bölge varsa o bölgenin durumunu ortaya koyar. Manyetik Rezonans (MR) submukozal tümör uzanımını BT'den daha iyi ortaya koymaktadır.

Genel anestezi altında yapılan direkt larengoskopi ve bu esnada alınan biyopsi ile daha kapsamlı bilgiler edinilmektedir. Bu bilgiler ışığında doktor, hasta ameliyata girmeden önce kanserin evrelendirmesi için birçok bulguya ulaşır. Biyopsi alınırken oldukça dikkat edilmelidir. Şüpheli lezyonlardan alınan biyopsi yüzeyinde enflamasyon olabilir. Dikkat edilmezse derindeki malign lezyonlar görülmeyebilir. Ventrikül ve subglottik bölge; diagnostik larengoskopi ile incelenirken zorlu iki bölgedir. Özellikle vejetan büyük tümörlerde kesin tanı ve gerekli ise konservatif cerrahi kararı cerrahi eksplorasyon sonrası verilebilir. Bu işlemlerden sonra özefagus, bronşiyal sistem, trakeada ikinci primer tümör araştırılmalıdır (Flint ve ark., 2010).

Larenks kanserlerinde iki çeşit tedavi yöntemi bulunmaktadır. Radyoterapi ve cerrahi yöntemleriyle hastaya uygun şekilde seçim yapıp tedavi edilmektedir. (Başer, 2002). Bu iki yöntemden biri seçilirken, yönteminin avantajları olduğu kadar dezavantajları vardır. Tümöre bağlı olan bazı faktörler; yayılımı, yeri, evresi, boyunda metastaz gerçekleşmesi, hangi tedavi yöntemi seçilirse en çok kür olanağı, larenks işlevlerinin devamı tedavi seçimi için önemlidir. Tümöre bağlı özelliklerle birlikte avantaj ve dezavantajlar hastaya göre değişebilmektedir Hastanın yaşı, mental durumu, varsa kronik rahatsızlıkları, hastanın istekleri, mesleği, mesleğinde sesinin önemi, kardiopulmoner durumu tedavi yöntemini belirlemede önemlidir. Tedavi için uygun yaklaşımda farklı disiplinlerin bir arada çalışması esastır. Multidisipliner yaklaşım sonucu hastaya göre belirlenecek tedavi yöntemine göre tedavi süreci başlar. Cerrahi tedavi uygulanacaksa, primer tümörün rezeksiyonu (larenjektomiler) ve bölgesel lenf nodlarının eksizyonun (boyun diseksiyonları) yapılması gerekmektedir (Engin ve Erişen, 2003). Larenks kanserinde metastaz varlığına ve evresine göre boyun diseksiyonları uygulanabilir. T1, T2 erken evre glottik kanserlerde boyun metastazı insidansı son derece düşüktür ve elektif boyun diseksiyonunun yeri yoktur. Erken evre supraglottik larenks kanserlerinde patolojik

lenf nodu negatif olsa bile, yüksek oranda ve çift taraflı boyun metastazı yapma potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla tedavi planı her iki boynu da içermelidir. Çift taraflı boyun disseksiyonuyla (genellikle selektif yeterlidir) birlikte uygulanan parsiyel larenjektomiler hastalığın patolojik olarak kesin evrelemesini ve gerekirse ek tedavi planlarının yapılabilmesini sağlar.

T3 ve T4 ileri evre glottik kanserler bölgesel metastaz yapma potansiyeline sahiptir. Boyun N(-) lerde tümörün evresine göre ipsilateral veya çift taraflı boyun disseksiyonu uygulanır.

2.1.4.1. Radyoterapi

Tümörün yerine, derecesine, metastazlarının varlığına, hastaya göre radyoterapi primer veya yardımcı tedavi olarak seçilebilir. Hastalarda larenks fonksiyonlarının bozulmaması için eğer erken evre ve uygun olduğu düşünülüyorsa cerrahi yöntemlere göre tercih edilmektedir.

2.1.4.2. Kemoterapi

Larenks kanserinde tek tedavi olarak günümüzde kullanılmamaktadır. En sık kullanılan kombine ilaç Cisplatin+5-Fluorouracil'dir. Yineleme tedavilerinde de radyoterapi ile kombinasyon olarak kullanılmaktadır.

2.1.5. Larenks Kanserinde Kullanılan Biyomarkerlar

Hücrelerin risk faktörlerine maruz kalmaları sonucu hücrede kanser gelişebilir. Bu durum klinik olarak bir bulgu vermeden önce bazı markerlarda meydana gelen değişim fark edilirse daha erken önlem alınabilir ve önleyici tedaviler ile tedaviye daha erken başlanabilir. Bu da tedavinin vereceği olumlu yanıt oranını artıracaktır. Markerlar kullanıldıkları kanser türü için özgüdür ve oradaki değişimi ortaya koyar.

2006'da yapılan bir çalışmada bazı fonksiyonlar ve bunların larenks kanserli hücrede değişen görevleri sıralanmıştır. Epidermal growth factor; sağlıklı hücrede büyüme faktörleri için tirozinkinaz aktivitesi taşır ancak larenks kanserli hücrede agresif ve invaziv özellik gösterir. Telomeraz aktivitesi sağlıklı hücrede normal düzeylerde bulunurken larenks kanserli hücrelerde artmaktadır. Cyclin D1 geni de larenks kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere göre daha yüksek düzeylerde bulunmaktadır (Sayılğan, 2006).

2.1.5.1. Hücre Dışı Sirküler Nükleik Asitler

Nükleik asitlerin, çeşitli vücut sıvılarında bulunduğu çok uzun zamandır bilinmektedir. İlk çalışma 1940'lı yıllarda yapılmasına rağmen, özellikle son 20-30 yıl içerisinde hücre dışı nükleik asitlere ilgi artmıştır. Bu bağlamda, çeşitli çalışmalar yapılarak hem miktarsal hem de moleküler karakterizasyonları hem sağlıklı hem de hasta gruplarında araştırılmıştır. 1940'lı yıllarda yapılan ilk çalışmalarda, sağlıklı ve hasta bireylerin plazma örneklerinde serbest DNA ve serbest RNA'lar ölçülebilmektedir (Mandel 1948). Nükleus kökenli DNA'nın varlığının yanında mitokondrial kökenli DNA'nın varlığı da bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, nükleer DNA'nın serbest şekilde bulunduğu ancak mitokondrial DNA'nın hem serbest hem de bazı partiküllere bağlı olabileceği bildirilmiştir (Zachariah ve ark., 2009). Sağlıklı bireylerde, örneğin lökositlerin ölümüyle bir miktar DNA kanda serbest hale geçtiği ve herhangi bir hastalığı bulunmayan bireylerde de bu nedenle belli bir miktarda serbest DNA olduğu belirtilmiştir. Ancak miktarı bireye göre değişen serbest haldeki nükleik asitlerin bazı hastalık durumlarında farklılaştığı bildirilmiştir (Giacona ve ark., 1998; Chang ve ark., 2003). Özellikle farklı patolojilerde görülen hücre ölümleri, doku tahribi ve iltihabi durumlar ile aralarında yakın ilişki olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda, hücre dışında normal değerlerden fazla DNA, RNA, miRNA gibi nükleik asitlerin varlığı tespit edilmiştir. Örneğin, tümoral kaynaklı onkogenik DNA'nın varlığının tespit edilmesinin yanında, otoimmün hastalıklar gibi hastalıklarda yüksek miktarda hücre dışı DNA tespit edilmiştir (Butt ve Swaminathan 2008; Wagner 2012). Özellikle DNA miktarı ve daha sonra içeriği hastalıklar için invazif olmayan birer kan biyomarkeri olabilme potansiyeline sahiptir. CcfDNA boyutunun ve özelliğinin de bireyin sağlık durumuna göre değişmesi birçok hastalık grubu için spesifik bir biyomarker olabileceğini ortaya koymuştur (Deligezer ve ark., 2006).

Hücre Dışı Sirküler DNA (ccfDNA)

Sirkülasyonda bulunan DNA'nın bulunma şekli ile ilgili farklı yaklaşımlar mevcuttur. Hücre dışında çıkmış DNA'nın kromatin yapıda, yani DNA ve dört çeşit histondan oluşan nukleozom şeklinde olabileceği gibi, protein ve apoptotik yapılara bağlı şekilde bulunabileceği bildirilmiştir (Van Der Vaart ve Pretorius, 2008; Peters ve Pretorius, 2011). Serbest haldeki bu maddeler sağlıklı insan plazmasında da

bulunmaktadır. Ancak organizma ölü hücrelerden fagositoz ile temizlendiği için miktarın daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı bireylerde yapılan ölçümlerde serbest DNA'nın normal konsantrasyonu 0 ile 100 ng / mL kan, ortalama 30 ng / mL olarak gözlenmiştir.

Sirküler DNA'nın bulunma şeklinin daha çok bireyin içinde bulunduğu duruma bağlı olduğu bilinmektedir. Nükleik asit miktarının, birçok akut ve kronik hastalıkta arttığı tespit edilmiştir (Wagner, 2012). Bu kapsamda farklı hastalıklarda, farklı serbest DNA şekilleri bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda bazı otoimmün hastalıklar, travma ve inme durumlarında kanda ccfDNA varlığının arttığı gözlenmiştir (Butt ve Swaminathan, 2008). Diyabetli, romatid artritli, lenfomalı çocuklar ile yapılan bir çalışmada, jel elektroforezi ile elde edilen serbest DNA bantları, apoptotik bir hücredeki ile benzerlik göstermiştir. Benzer şekilde, farklı hasta gruplarında, nükleozom sayısının ve DNA iplik baz büyüklüklerinin hem sağlıklı hem de hasta bireylerde farklı olduğu bildirilmiştir (Holdenrieder ve ark., 2006; Holdenrieder ve ark., 2008; Schwarzenbach ve ark., 2011). Artmış hücre dışı DNA miktarının sepsis, bazı kanser türleri ile kardiyovasküler hastalıkların birer biyomarkeri olduğu tespit edilmiştir (Butt ve Swaminathan, 2008).

Başka bir çalışmada serum DNA konsantrasyonunun malignitede belirgin şekilde arttığını ve benign hastalıkta normal kontrollerle karşılaştırıldığında orta derecede arttığını göstermektedir (Shapiro ve ark., 1983). Bazı kanser türlerinde de metastaz ve nüks, dolaşımda yüksek düzeyde tümör kaynaklı DNA varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Over kanserinde ccfDNA belirleyici bir biyomarker olarak kabul görebileceği ortaya konmuş ancak daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur (Kamat ve ark., 2010).

Miktarsal farklılığın yanında, özellikle ccfDNA'nın yapısındaki genomik, epigenomik değişimliler ile var olan iplik uzunlukları gibi parametrelerin ise bazı hastalıklar için spesifik olduğu belirtilmiştir (Schwarzenbach ve ark., 2011). Servikal kanser hastalarında yapılan bir çalışmada HPV16 / HPV18 ölçülmüştür. Bu kişilerin %50'sinde hastalıkları esnasında plazmalarında HPV-DNA görülmüş olup daha sonraki iyileşme döneminde rastlanmamıştır. Bu nedenle plazma HPV-DNA'nın servikal kanserde tedaviye yanıtı incelemek adına bir biyomarker olabileceği düşünülmüştür (Yang ve ark., 2004).

Serbest hale geçen DNA, serum ve plazmada bulunabildiği gibi diğer vücut sıvılarında da bulunmaktadır. İdrar, sinovyal sıvı, tükürük ve beyin omurilik sıvısı gibi diğer vücut sıvılarında da DNA serbest halde bulunur (Wagner, 2012). Vücut sıvılarında tespit edilen nükleik asitler için bazı mekanizmalar ileri sürülmektedir. Kanser hastalarında yapılan çalışmalarda kanda ccfDNA'nın fazla olmasının nedeninin tümör hücreleri olduğu bulunmuştur. Kanda serbest halde dolaşan serbest nükleik asitler için farklı kaynaklar belirlenmiştir. Bunlar, lökositlerin parçalanması, bakterilerin parçalanması, virüsler, mitokondriyal DNA, hücre veya doku nekroz, hücre apoptozu, hücresel eksozomların serbest hale geçmesi, hücresel RNA'ların serbest kalması, virtisom, parazit nükleik asitleri, transpozon ve retrotranspozon ile lökosit yüzey DNA'ları olarak belirtilmiştir (Gahan, 2016). Serbest nükleik asitlerin asıl kaynağının ölü hücreler olduğu tahmin edilmektedir. Ancak, diğer taraftan yapılan çalışmalarda, canlı hücrelerden de DNA ve RNA'ların serbest hale geçtiği tespit edilmiştir.

Plazmada bulunan ccfDNA elektroforez ile incelendiğinde apoptozis sonucu salınan ccfDNA'dan farklı olarak nekroz ile türetilen cfDNA, elektroforetik olarak jeller üzerinde akarken lekeler oluşturduğu için fark edilmektedir. Böylece nekrozun da ccfDNA'nın plazmaya salınmasında etkisi olduğu tahmin edilmektedir (Wang ve ark., 2003; Derakhshan, 2007). Plazmada serbest halde bulunan ccfDNA'ya jel elektroforezi uygulandığında DNA'ların boyutu ölçülerek apoptozis kaynaklı olup olmadığına bakılmıştır. Apoptozisin ccfDNA için önemli bir kaynak olduğu anlaşılmıştır (Derakhshan, 2007).

Eksozom kesecikleri; hücrelerden salınan neredeyse tüm vücut sıvılarında bulunan yapılardır. Hücrelerin birbirleriyle haberleşme kaynakları genetik materyal aktarımı ve hücresel immün yanıt gibi bir çok hayati biyolojik olayda spesifik rolleri olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (Théry ve ark., 2009). DNA içeren eksozomların düşük seviyedeki DNA / RNA'nın ccfDNA'lara katkısı olduğu görülmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda ccfDNA'nın bazı kanser türleri için biyomarker olarak kullanılabilmesi ortaya konmuştur (Pietrasz ve ark., 2016). Ancak yapılan çalışmalarda ccfDNA'nın birçok hastalıkta arttığı gözlemlenmiştir ve bu nedenle tek başına bir biyomarker olamayacağı da düşünülmektedir (Gahan, 2016). Kanser

hastalarının ileri dönemlerdeki erken nüks veya ilerlemeyi tanımlamak için hastaların izlenmesinde ccfDNA'nın kullanılmasının olası olduğu incelenmiştir. ccfDNA'nın izole edilip araştırılması geleneksel yöntemlere göre daha kolay ve ucuzdur. Bu nedenle tümör ilerlemesinin taranması, tümör genetiği, tümör yükü, ilerleme ve ilaç direnci mekanizmaları hakkında bilgi edinmek için ccfDNA araştırılmaya başlanmıştır.

Hücre Dışı Sirküler RNA (ccfRNA)

Ribolukleaz (RNase) RNA'yı parçalama özelliği olan bir enzimdir. Serumda yüksek miktarda bulunurken, kanserli bireylerin plazmalarında da yüksek miktarda olduğu bilinmektedir (Reddi ve Holland, 1976). Kanda yüksek miktarda RNase bulunmasına rağmen, hücre dışına çıkmış ve ölçülebilecek miktarda farklı RNA'ların varlığı önem arz etmektedir. Bu yaklaşım, dolaşımda stabil olarak bulunan RNA'ların korunduğu fikrini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, RNA'ların, çift lipit tabakası taşıyan bir vesikül ile çevrelendiği ve bu şekilde RNase'dan korunduğu, dolayısı ile dolaşımda stabil olduğu söylenebilir (Rapisuwon ve ark., 2016). Bu veziküller, ekzosomlar, mikrovesiküller ve apoptotik yapılar şeklinde bulunabilmektedirler. Veziküller, normal veya kanserli hücrelerden kökenlenmekte, değişik molekülleri farklı yerlere taşımakta ve böylelikle farklı hücrelerde rol almaktadırlar (Valadi ve ark., 2007; Kanada ve ark. 2015; Rapisuwon ve ark., 2016). Yapılan çalışmalarda, plazmadan elde edilen ekzosomların, farklı RNA tiplerini içerdiği görülmüştür. miRNA, piRNA, mRNA ve lncRNA olarak tespit edilen RNA'ların miktarlarının farklı olduğu ifade edilmiştir (Freedman ve ark., 2016).

RNA ile ilgili çalışmalar, daha çok spesifik mRNA türlerini kapsamaktadır. Total RNA miktarı ile ilgili çok az sayıda çalışma olduğu gibi diğer nükleik asitler ile ilişkileri hakkındaki bilgiler de yok denecek kadar azdır. Miktersal olarak RNA'nın kadınlarda 36 ng/ml ve erkeklerde 126 ng/ml olduğu bildirilmiştir (Tamkovich ve ark., 2005). Kodlama yapmayan RNA'lar (non-coding RNA), kodlama yapmayan DNA tarafından aktif olarak kodlanır. Bunlar, uzun kodlama yapmayan RNA'lar (lncRNA), mikro RNA'lar (miRNA), kısa RNA interfreans (siRNA), piwi etkileşimli RNA (piRNA) gibi RNA'ları içermektedir. PiRNA 26-31 nukleotitten oluşan, transpozonları baskılayan ve mRNA'yı hedef alan, PIWI proteinleri aracılığı ile bu süreçleri yöneten bir RNA çeşididir (Rapisuwon ve ark.,

2016). Plazmada bol bulunurlar. Spesifik olarak bazı piRNA'ların kolorektal kanser, prostat kanseri ve pankreatik kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Rapisuwon ve ark., 2016). Nuklear ve nukleolar RNA'lar (snRNA ve snoRNA) genellikle 60-300 nukleotid uzunluğundadır. Bazı kanser türlerinde bu iki RNA türlerinin anlatımlarının olduğu bildirilmiştir. Örneğin, meme kanserinde, bu iki RNA çeşidinin anlatımlarının arttığı görülmüştür (Valleron ve ark., 2012).

Hücre dışında bulunan DNA'nın keşfedilmesi ile RNA'nın da varlığı ortaya konulmuştur. Ancak, DNA kadar ilgi görmemiştir. İnsan serum ve plazmasında farklı tipte RNA'lar bulunmaktadır. Sirküler dolaşımında, mesajcı RNA (mRNA), miRNA, piRNA, taşıyıcı RNA (tRNA), ribozomal RNA (rRNA) gibi RNA çeşitlerinin yanında diğer bazı RNA türlerinin de olduğu bilinmektedir. Genel olarak, sirküler dolaşımında küçük veziküller içerisinde paketlenmiş olarak bulunmaktadır. RNA molekülleri, DNA moleküllerinin serbest hale geçmesine neden olan mekanizmalar ile serbest hale geçmektedirler. Lökositlerin parçalanması, bakterilerin parçalanması, virüsler, mitokondriyal DNA, hücre veya doku nekrozu, hücre apoptozu, hücrel eksozomların serbest hale geçmesi gibi süreçler hücrel RNA'ların serbest kalmasına neden olmaktadır. Örneğin, lökositler bağışıklık merkezinin bir parçası olup, vücudu yabancı maddelere mikroplara ve bulaşıcı hastalıklara karşı korurlar. Lökositler parçalandıkları zaman plazmada RNA görülmektedir.

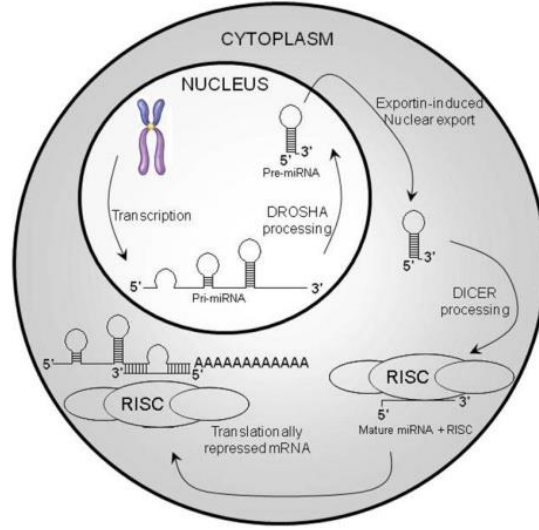
Diğer taraftan, serbest hale geçen RNA'nın önemli bir kısmının özellikle dolaşımdaki eritrosit ve lökosit zarlarına yapışık olduğu tespit edilmiştir. 1999 yılında yapılan çalışmalar RNA'nın ilk defa klinik anlamda önemini ortaya koymuştur. Bu çalışmalarda, malignant melanomalı hastaların serumlarında tumor mRNA'ların varlığı tespit edilmiştir (Kopreski ve ark., 1999). Ayrıca, Epstein-Barr virus tarafından kodlanan RNA'nın varlığı ilk defa nasopharyngeal kanserli bireylerin plazmalarında gösterilmiştir (Lo ve ark., 1999). Vücut sıvılarında tespit edilen farklı RNA türleri çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmeleri nedeni ile biyomarker olabilecek potansiyele sahiptirler. Bundan dolayı, serbest RNA'ların özellikle bazı hastalıkları teşhis edebilecek nitelikte olabileceği bildirilmiştir (Tong ve Lo, 2006). Örneğin, plazma RNA analizinin kanserin teşhisi ve izlenmesi için önemli bir molekül olduğu bildirilmiştir (Lo ve Chiu, 2004).

mRNA, protein sentezinde önemli bir fonksiyonu olan bir RNA çeşididir. Sirküler mRNA, 1990'lı yıllarda tespit edilmiş ve daha sonra gastrik kanser, pankreatik kanser (Funaki ve ark., 1996), nasofarengeyal karsinome (Lo ve ark., 1999) ve melanomalı bireylerin (Kopreski ve ark., 1999), vücut sıvılarında mRNA tespit edilmiştir.

Hücre Dışı Sirküler MikroRNA (ccfmiRNA)

Mikro RNA (miRNA) tek sıralı nükleotid dizisinden oluşan 21-23 nükleotit uzunluğundaki tek zincirli RNA molekülleridir. Tüm ökaryotik hücrelerde bulunurlar. İlk bilinen miRNA; lin-4 olup, 1993 yılında Ambros ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans*ta lin-4'ün hiçbir proteini kodlamadığının anlaşılmasıyla keşfedilmiştir (Lee ve ark., 1993). MiRNA'lar protein sentezinde görev almazlar (Guil ve Esteller, 2009). Görevleri, mRNA'ların protein sentezini ilgili ribozom bağlanma bölgelerine bağlanarak üreteceği proteini sentezlemesini engellemektir. Görevlerini 3'-UTR'lerine bağlanarak hedef mRNA'ları düzenleyerek bir veya birden fazla mRNA üzerinde etki göstererek yaparlar (Singh ve ark., 2008). Güncel olarak bilinen 460'dan fazla insan miRNA'sı bulunmaktadır. Mikro-RNA'lar hücrelerde değişen sayılarda bulunmaktadır. En çok tespit edilen 593 miRNA'nın ortak kısmı miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p ve miR-99b-5p'dir (Gahan, 2016). Mikro-RNA'lar protein sentezini; protein translasyonunu inhibe ederek veya mRNA'yı tahrip ederek sağlarlar. Görevleri nedeniyle; hücre gelişimi, hücre çoğalması, hücre ölümü, apoptozis, metastaz, mutasyon, epigenetik susturma ve anjiyogenez gibi hücre için hayati önem taşıyan biyolojik olaylarda önemli görevler alırlar (Di Leva ve ark., 2014). Kanserde miRNA disregülasyonu görülür. Ayrıca, hücre bölünmesi, apoptosis, metastasis, anjiyogenesis gibi süreçlerde önemli rol oynarlar (Di Leva ve ark., 2014). Birçok onkogenin ve tümör baskılayıcı genin fonksiyonları miRNA'lar tarafından düzenlenir. Birçok miRNA kodlayan gen özellikle kromozom kırılmaları ve amplifikasyonu gibi duyarlı bölgelerde yer alırlar (Calin ve ark., 2004). Hücre düzeyindeki bu olaylar aynı zamanda kanserin başlaması ve ilerlemesinde de yer alan hücresel olaylardır. Spesifik olarak farklı mikro RNA tiplerinin plazmada tespit edildiği ve sirküler bazı miRNA'ların bazı kanser türleri için spesifik olduğu bildirilmiştir (Garzon ve ark., 2009). Yani miRNA'lar normal şartlarda hücre fizyolojisi için hayati öneme sahip olduğu kadar,

yanlış ifadeleri veya mutasyonları karsinojeniz ile ilişkilidir. Bu ilişki nedeniyle kanser türlerini miRNA profillerine göre sınıflayabiliriz (Kanwal ve ark., 2015).



Şekil.1 MicroRNA çalışma düzeni (Baccarelli ve Bollati, 2009)

MiRNA'ların %50'den fazlasının hücre içinde buldukları konum akciğer, göğüs ve beyin kanserleriyle ilişkili genomik bölgelerdedir (Zhang ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda çoğu kanser hastalarında kandaki miRNA seviyesi yüksek ölçülmüştür. Bu durumun nedeninin miRNA'nın kanserde serbest dolaşıma bırakılması olduğu düşünülmektedir. Ancak bazı çalışmalarda da hasta ve sağlıklı birey grubunda anlamlı fark görülmemiştir (Deligezer ve ark., 2006).

MiRNA'ların özellikleri tümöre göre değişmektedir; örneğin, epitelyal menşeli katı kanserlerde, lösemilerde ve lenfomalarda, miR-155 yüksek oranda eksprese edilir ve bir onkogen gibi işlev görmektedir. Ancak endokrin tümörlerde ise oldukça düşük regüle edilir ve muhtemelen bastırıcı fonksiyonlara sahiplerdir (Nicoloso ve ark., 2009). Kolorektal kanserli hastalarda yapılan başka bir çalışmada miR-17-3p ve miR-92'nin anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (NG ve ark., 2009). Bir başka miRNA olan miR-100'ün insan kanserlerinde azaldığı bulunmuştur (Paranjape ve ark., 2009). Malign hücrelerdeki bu miRNA değişimlerinin nedenleri epigenetik mekanizmalar ile açıklanabilmektedir (Calin ve Croce, 2006)

MiRNA'ların tümör hücrelerinin gelişimlerini ve profillerini ortaya koyduğu görülmüştür. Bu bilgiler ışığında çeşitli kanserlerde miRNA'ların farklı özellik gösterdiği ve kanser tanılarında biyomarker olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Lu ve ark., 2005).

MiRNA'ların hücrede gen baskılayıcı olarak görev yapması nedeniyle kanser tedavisinde tümör baskılayıcı olarak kullanılabilceği düşünölmektedir. Bazı miRNA'lar onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilir. MiRNA'ların bu yapıları aracılığıyla hedeflendirme çalışmaları yapılarak geleneksel tedavi yönteminin daha etkin hale getirilebileceği düşünölmektedir (Kutanzi ve ark., 2011).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırma Türü

Tez çalışması, deneysel türde bir çalışmadır. Çalışma, larenks hasta grupları ve kontrol grubundan alınan insan periferik kan örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın temel amacı, larenks kanseri olan bireylerden alınan kan örneklerinden ayrılan plazma örnekleri kullanılarak hücre dışı nükleik asit miktarlarını belirlemek, bu miktarların sağlıklı olan bireylerden farklı olup olmadığını ortaya koymak şeklindedir. Bu şekilde, hücre dışı sirküler nükleik asitlerin larenks kanseri için birer biyomarker olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklem Seçimi

Bu çalışmada, daha önce tanı ve tedavisi gerçekleşmiş 46 larenks karsinomlu olgu ve 46 kontrol grubu olmak üzere toplam 92 birey değerlendirilmiştir. Kanserli hastaların klinik öyküsü, yaş, cinsiyeti, mesleği, pestisite maruziyeti, sigara alışkanlıkları, operasyon öyküsü, radyoterapi ve kemoterapi alıp almadığı ile fizik muayene bulguları kayıt edilmiştir. Uygulanan tedavi tipi, nüks ve metastaz göz önüne alınmış ve kaydedilmiştir. Özellikle kırsal kesimde yaşayan ve tarımla uğraşan hastalardan ilaçlama yapanlar veya herhangi bir nedenle tarım ilacına maruz kalanlar pestisid kullanan gruba dahil edilmiştir. Tüm hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin kan ve plazma örnekleri daha önce alınmış ve uygun koşullarda (-80 °C) saklanmıştır. Çalışmada, kontrol grubu olarak 40 yaş ve üzeri herhangi bir maruziyeti bulunmayan, ek hastalığı olmayan, herhangi bir nedenle ilaç kullanmayan ve ailesinde kanser öyküsü olmayan bireyler dahil edilmiştir. Benzer şekilde, kontrol grubuna ait demografik özellikler kaydedilmiştir.

3.2. Veri Toplama

Hastaların tanısı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalında 2009-2015 arasında yapılmıştır.

3.3. Etik

Tez çalışması, deneysel türde bir çalışma olup Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanan rapor ile yürütülmüştür (2011-KAEK-27/2018-E.1800185667 no'lu).

3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan kan örnekleri daha önceki yıllarda alınan örnekler olduğu için populasyonlar seçilememiştir. Hasta grubunda kadın hasta olmaması çalışmanın eksik yönünü oluşturmuştur.

3.3.Kan Örneklerinin Alınması ve Deneysel Sürece Hazırlanması

Bu çalışmada hücre dışı nükleik asit miktarının ölçümü tam kandan ayrılan plazma örneklerinde ölçülerek belirlenmiştir. Bu amaçla, kan örnekleri alınır alınmaz, laboratuara transfer edilmiş ve aşağıdaki işlemler uygulanarak plazmaları ayrılmıştır. Steril 15 ml'lik tüplere aktarılan kan örnekleri, 3000 g'de 10 dk santrifüjde çevrilmiştir. Bu aşamadan sonra, steril mikro pipet yardımıyla üsteki sarı sıvı alınıp, steril 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Ependorf tüpler soğutmalı santrifüjde +4 °C 16000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda steril mikropipetle tüpteki üsteki kısım (altta 0.1 ml'lik bırakılır) temiz steril ependorf tüpe alınmış ve ependorf tüpteki plazma -80 °C saklanmıştır. Bu örnekler, hücre dışı serbest nükleik asit miktarı belirleme için kullanılmıştır.

Kan örneklerinden elde edilen plazmalarda ccfDNA, ccfmiRNA, ccfRNA miktarı araştırılırken Thermo Fisher Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ve Qubit 2,0 cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz floresans parametrelerini ölçme yöntemine dayanarak çalışmaktadır. Floresans ölçümünün prensibi; kullanılan hedef seçici boyaların DNA, RNA veya proteine bağlandığında floresans yayması ve bunun standart çözeltilere göre karşılaştırılarak yoğunluğun belirlenmesidir. Boyalar, sadece floresans yayar ve bozulmuş DNA veya RNA dahil olmak üzere kirleticilerin etkilerini en aza indirir. Kısa zamanda sonuç veren bu yöntem, UV emilimine göre çok daha hassastır ve seyreltik örnekleri daha doğru bir şekilde ölçebilir.

3.4. Verilerin Değerlendirilmesi

3.4.1. Kan Plazmasında ccfDNA Miktar Tayini

Her iki gruba ait hücre serbest DNA miktarı, daha önce hazırlanmış plazma örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler, Thermo Fisher Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ve Qubit 2,0 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan kitin çalışma yönergelerine göre deneyler planlanmış ve ölçümler gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada, içerisinde DNA miktarı bilinen örnek kullanılarak bir standart eğri

oluşturulmuştur. Bu eğri kullanılarak, hasta ve kontrol grubundaki bireylere ait örneklerin DNA miktarları belirlenmiştir.

3.4.2. Kan Plazmasında ccfmiRNA Miktar Tayini

Plazmada total ccfmiRNA miktarı fluorometrik olarak Qubit 2.0 cihazı kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Ölçümler, Thermo Fisher Qubit™ microRNA Assay Kit kullanılarak yapılmıştır. DNA ölçümüne benzer bir yöntemle, bilinmeyen örneklerin miktarları tespit edilmiştir.

3.4.3. Kan Plazmasında RNA Miktar Tayini

Plazmada total ccfmiRNA miktarı fluorometrik olarak Qubit 2.0 cihazı kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Ölçümler, Thermo Fisher Qubit™ Qubit™ RNA HS Assay Kit kullanılarak yapılmıştır. DNA ölçümüne benzer bir yöntemle, bilinmeyen örneklerin miktarları tespit edilmiştir.

3.4.4. İstatistiksel Analiz

Hücre dışı moleküllerin gruplar arasındaki farklılığı Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Popölasyonlara ait diğer faktörlerin etkilerini görmek için çoklu regresyon analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Parametreler arasındaki ilişkinin ortaya konulması için Spearman Rho korelasyon testi uygulanmıştır.

4.BULGULAR

Tez çalışmasına dahil edilmiş olan 46 adet larenks karsinomalı hasta grubu daha önce Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda tanısı konmuştur. Ayrıca 46 bireyden oluşan kontrol grubunda da aynı analizler yapılmıştır. Her iki popülasyona ait karakteristik veriler Tablo 1'de verilmiştir. Bu bağlamda, 46 larenks kanserli birey 38 ile 81 yaşları arasındadır. Hasta grubunun yaş ortalaması 64.15 tir. Tüm hastalar erkektir. Ayrıca tüm hastaların sigara içtikleri tespit edilmiştir. Kanserli bireylerde, dört farklı tümör evresi (T) belirlenmiştir. Sıra ile sayıları T1 (n=15), T2 (n=20), T3 (n=8), ve T4 (n=2) şeklindedir (Çalışmada, bir larenks kanseri hastanın tümör evresi bilinmemektedir).

Tablo 1. Larenks kanserli bireyler ile kontrol grubuna ait karakteristik veriler

	Larenks Kanseri Hastaları, n (%)	Kontrol, n (%)
Total	46	46
Erkek	46 (100)	24 (52,2)
Kadın	0	22 (47,8)
Yaş	64.15 ±8,4	50.39 ±7.11
Sigara içme durumu		
Sigara içen	46 (100)	27 (58,7)
Sigara içmeyen	0	9 (19,6)
Belirlenemedi	0	10 (21,7)
Tümör Evreleri, n (%)		
T1	15 (32,6)	-
T2	20 (43,5)	-
T3	8 (17,4)	-
T4	2 (4,5)	-
Tümör Yeri		
Glottik	46 (90,2)	-
Supraglottik	5 (9,8)	-
Cerrahi		
Total Larenjektomi	6 (11,8)	-
Parsiyel	23 (45,1)	-
Endoskopik Rezeksiyon	20 (39,2)	-
Radyoterapi (RT)		
Var	24 (47,1)	-
Yok	22 (43,1)	-
Boyun lenf nodu		
Var	11	21,6
Yok	40	78,4

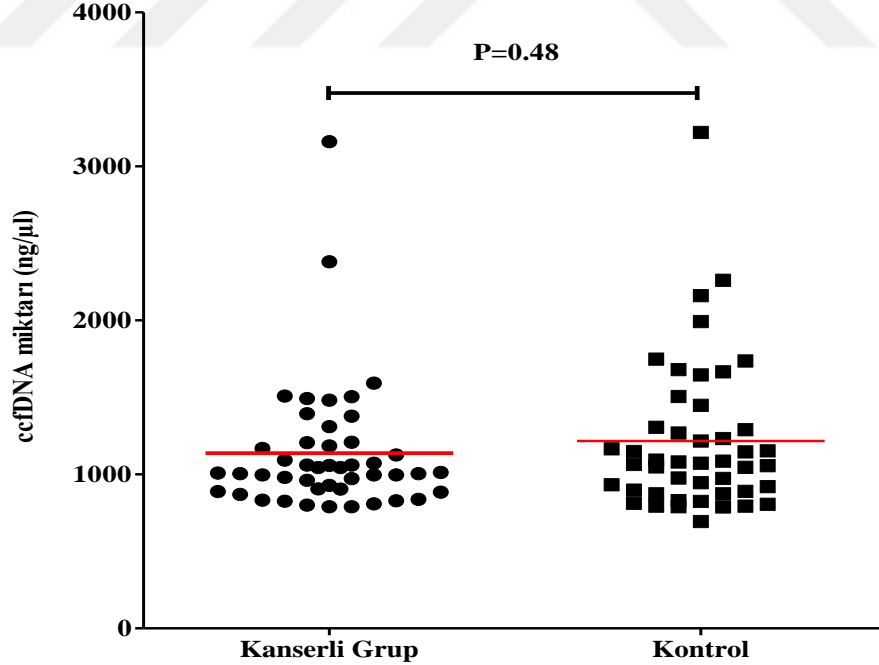
Diğer taraftan çalışmaya kontrol grubu olarak dahil edilen 46 bireye ait bazı özellikle Tablo 1’de verilmiştir. Kontrol grubunda bulunan bireylerin % 52,2’si erkektir. Bu grubun yaş ortalaması ise 50.39 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu bireyleri 40 ile 64 yaş aralığındadır.

Çalışmada, kanserli ve kontrol gruplarından elde edilen ccfDNA miktarları Tablo 2 ve Şekil 2’de verilmiştir. Buna göre, kanserli gruptan elde edilen ortalama ccfDNA miktarı 1137,9 ng/μl iken kontrol grubu için bu değer 1216,2 ng/μl olarak bulunmuştur. Her iki grupta elde edilen değerler Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, istatistiki açıdan aralarında bir fark olmadığı görülmüştür (p>0.05).

Tablo 2. Kanserli ve kontrol grubundan elde edilen ccfDNA miktarları (ng/μl)

	Kanserli grup (n=46)	Kontrol grubu (n=46)	P*
Ortalama	1137,9	1216,2	0.48
En az	790	694	
En fazla	3160	3220	
SS	420,8	483,7	

SS: Standart sapma, *: Mann Whitney U testi



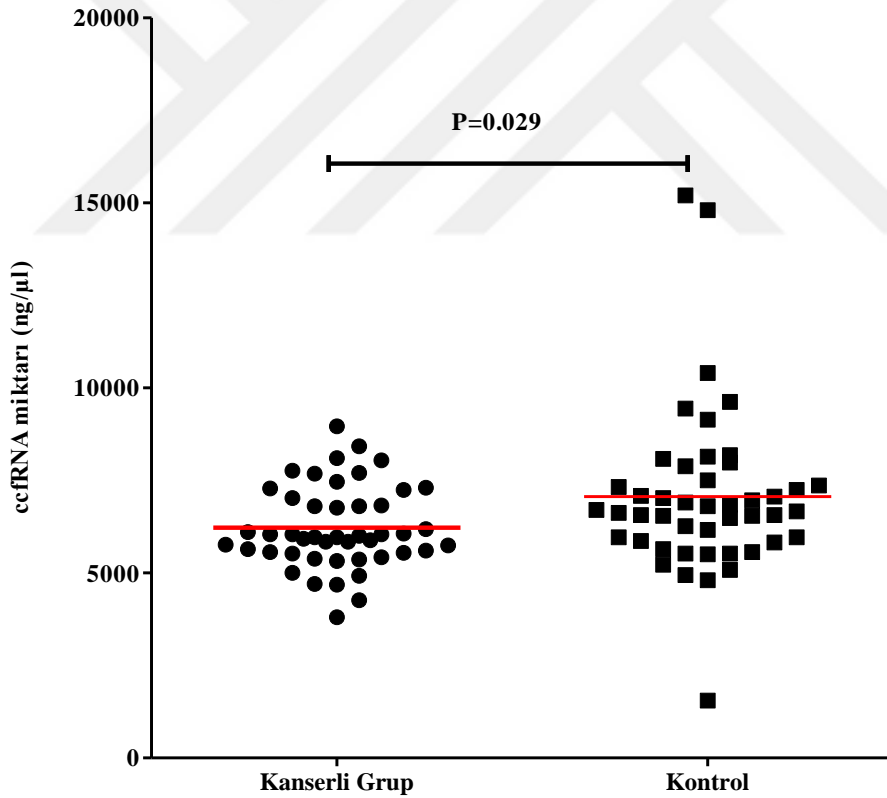
Şekil 2. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfDNA miktar dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Çalışmada, kanserli ve kontrol grubunda elde edilen ccfRNA miktarlarının kanserli bireylerde daha az olduğu görülmüştür (Tablo 3 ve Şekil 3). Kanserli grupta ccfRNA miktarı ortalama 6221,7 ng/μl iken bu değer kontrol grubu için 7064,1 ng/μl olarak tespit edilmiştir. Her iki grubun ortalama değerleri Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, kanserli bireylerdeki ccfRNA miktarının anlamlı şekilde daha az olduğu ölçülmüştür (p<0.05).

Tablo 3. Kanserli ve kontrol grubundan elde edilen ccfRNA miktarları

	Kanserli grup (n=46)	Kontrol grubu (n=46)	P*
Ortalama	6221,7	7064,1	0.029
En az	3800	1550	
En fazla	8960	15200	
SS	1120,9	2245	

SS: Standart sapma, *: Mann Whitney U testi



Şekil 3. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfRNA miktar dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

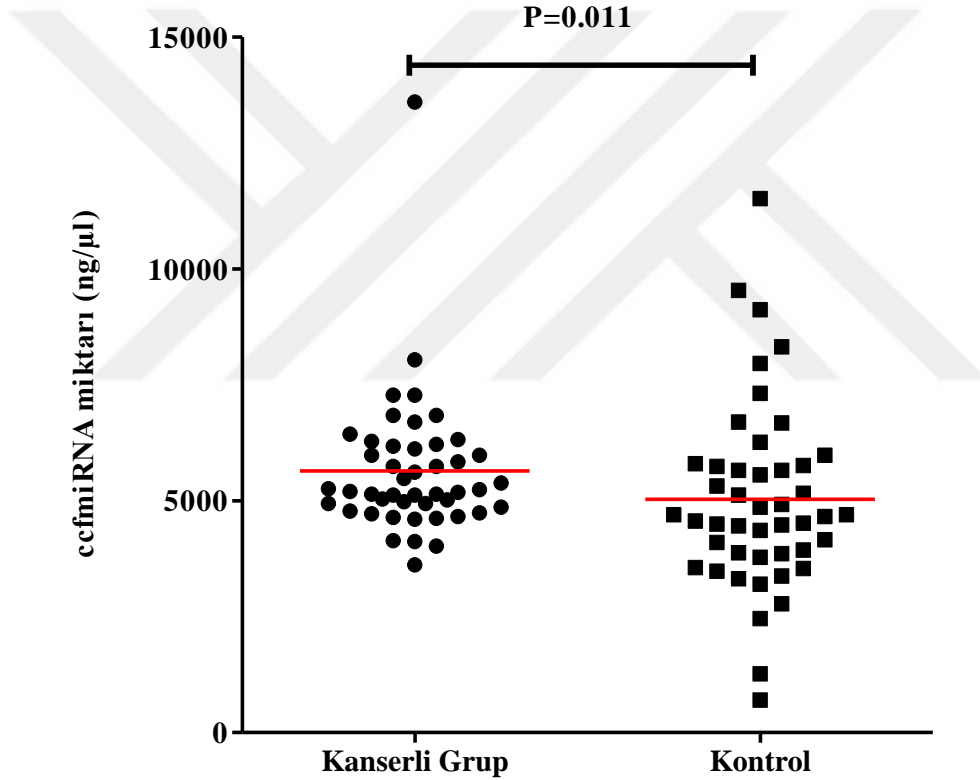
Çalışmada, kanserli ve kontrol gruplarında elde edilen ccfmiRNA miktarları Tablo 4 ve Şekil 4’te verilmiştir. ccfmiRNA miktarı kanserli grupta 5646,5 ng/μl iken, bu değer kontrol grubunda 5028,3 ng/μl olarak tespit edilmiştir. Kanserli grupta

elde edilen ccfmiRNA miktarının kontrol grubundan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki grupta elde edilen verilere Mann Whitney U testi uygulandığında, ortalamalar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4. Kanserli ve kontrol grubundan elde edilen ccfmiRNA miktarları

	Kanserli grup (n=46)	Kontrol grubu (n=46)	P*
Ortalama	5646,5	5028,3	0,011
En az	3620	700	
En fazla	13600	11520	
SS	1516,7	2023,5	

SS: Standart sapma, *: Mann Whitney U testi



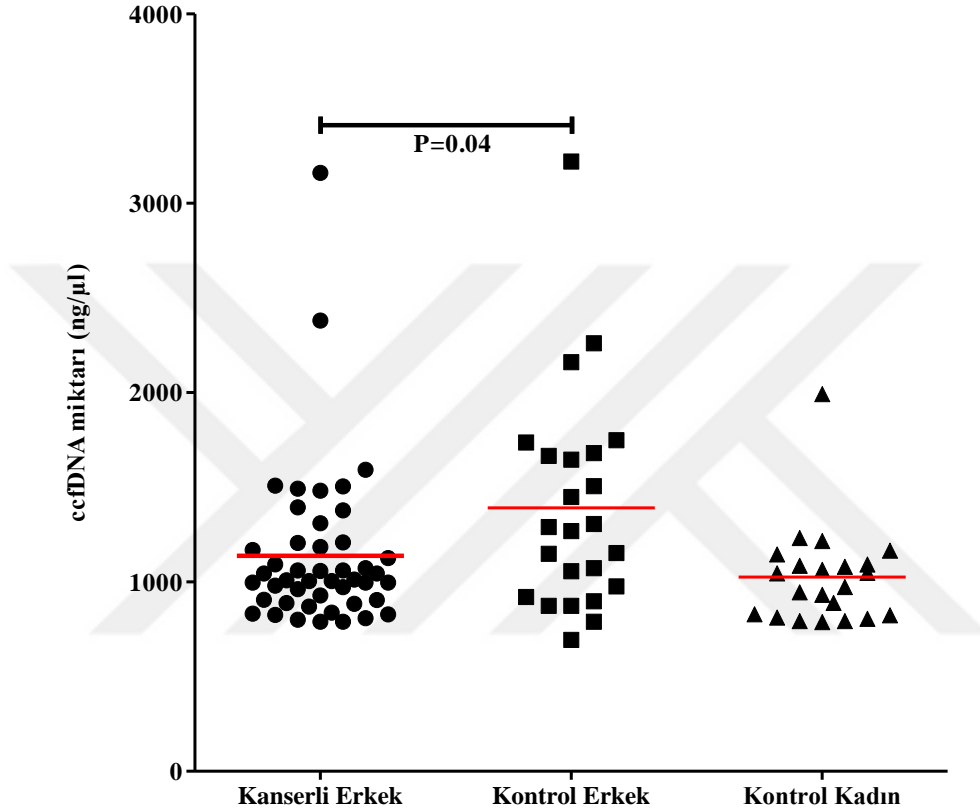
Şekil 4. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfmiRNA miktar dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Çalışmada, kanserli erkeğin ccfDNA miktarı kontrol grubunun erkekleri ile karşılaştırıldığında, istatistiki olarak düşük olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Benzer şekilde, kanserli erkekler ile kontrol grubu kadınlar karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 5 ve Şekil 5).

Tablo 5. ccfDNA miktarının cinsiyete göre dağılımı

	Kanserli grup	Kontrol grubu	P* değeri
Erkek	1137.9±420,8	1391.17±573,3	0,04
Kadın	-	1025.36±261,2	-

*: Mann Whitney U testi



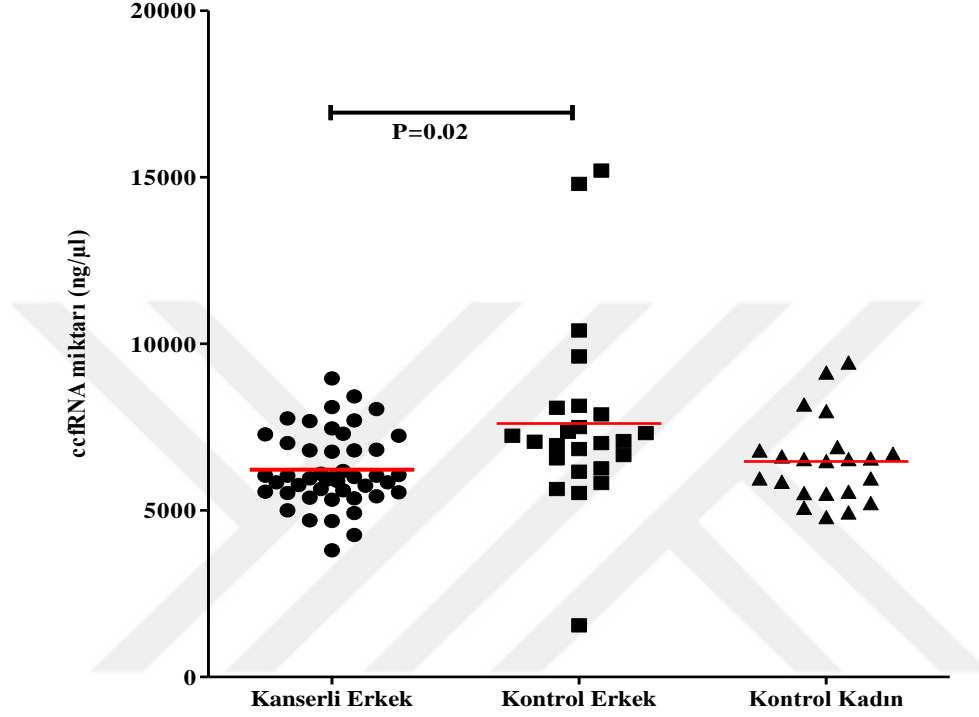
Şekil 5. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfDNA miktar cinsiyete göre dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Elde edilen ccfRNA miktarının cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde (Tablo 6 ve Şekil 6) kanserli erkek bireylerin ccfRNA miktarı, kontrol grubu erkeklerinkinden anlamlı şekilde düşük olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Kanser hastası erkek bireyler ile kontrol kadın grubu arasında bir fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$).

Tablo 6. ccfrNA miktarının cinsiyete göre dağılımı

	Kanserli grup	Kontrol grubu	P*
Erkek	6221,74±1120.9	7611,25±2782	0,02
Kadın	-	6467,27±1267	

*: Mann Whitney U testi



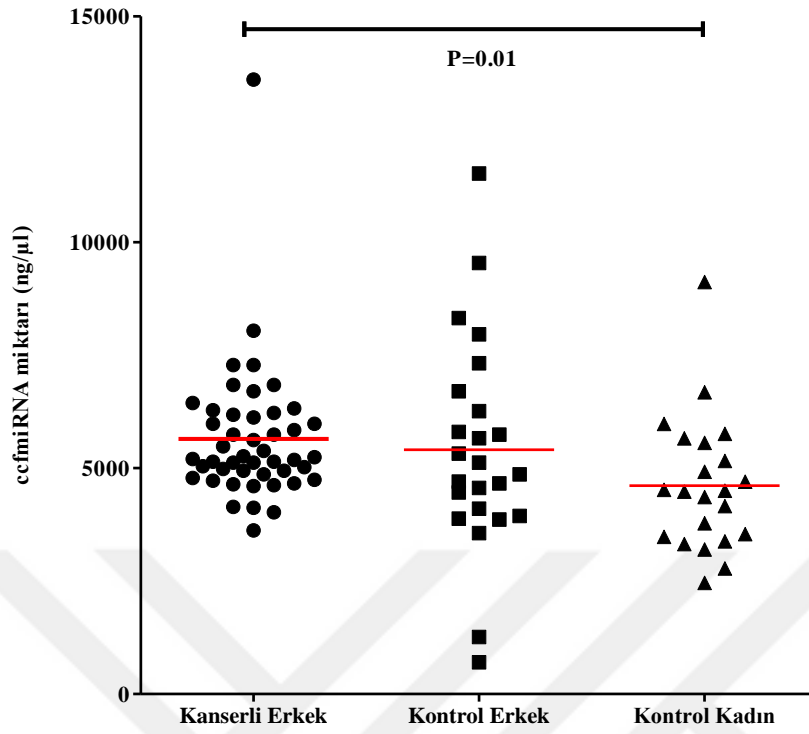
Şekil 6. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfrNA miktar cinsiyete göre dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

CcfmiRNA miktarının dağılımı cinsiyete göre (Tablo 7 ve Şekil 7) incelendiğinde kanserli erkeklerde elde edilen miktar kontrol grubu erkeklere göre fazla bulunmuştur. Ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak, kanserli erkeklerden elde edilen değer, kontrol grubu kadınlardan istatistiki olarak fazla tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Tablo 7. ccfmiRNA miktarının cinsiyete göre dağılımı

	Kanserli grup	Kontrol grubu	P*
Erkek	5646,52±1516	5408,5±2379	-
Kadın	-	4613,63±1492	0.001

*: Mann Whitney U testi

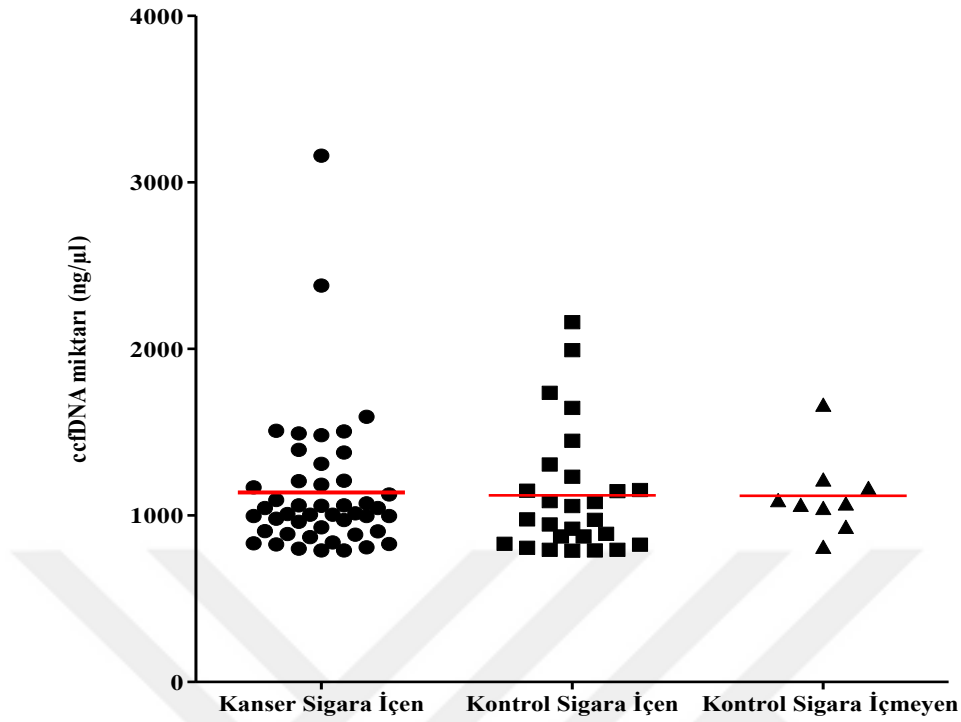


Şekil 7. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfmiRNA miktar cinsiyete göre dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Sigara kullanımına bağlı olarak ccfDNA miktarı Tablo 8 ve Şekil 8’ de verilmiştir. Buna göre, sigara kullanan kanserli ve kontrol grupları değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Benzer sonuç kanserli sigara kullanan ve kontrol sigara kullanmayan bireyler arasında elde edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Tablo 8. Sigara kullanımı bakımında ccf DNA miktar dağılımları

	Kanserli grup	Kontrol grubu	P*
Sigara İçen	1137,9±421	1121±375	$p>0.05$
Sigara İçmeyen	-	1118,4±237	

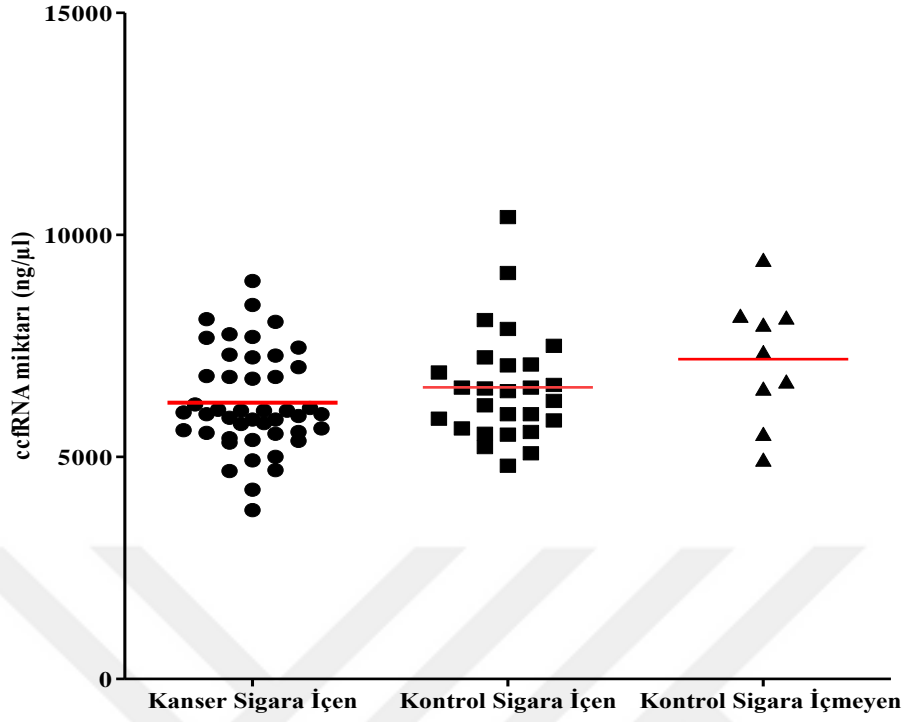


Şekil 8. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfDNA miktarı sigara kullanımına göre dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Sigara kullanımına bağlı olarak ccfRNA miktarı Tablo 9 ve Şekil 9 verilmiştir. Buna göre, sigara kullanan kanserli ve kontrol grubunda istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Ancak, kanserli sigara içen bireyler ve sigara kullanmayan kontrol grubu bireyler arasında istatistiksel açıdan anlamlı olmaya meyilli bir fark ölçülmüştür ($p > 0.05$).

Tablo 9. Sigara kullanımını bakımında ccfRNA miktar dağılımları

	Kanserli grup	Kontrol grubu	P*
Sigara İçen	6221,7±1120	6569,6±1249	P=0.06
Sigara İçmeyen	-	7200±1419	

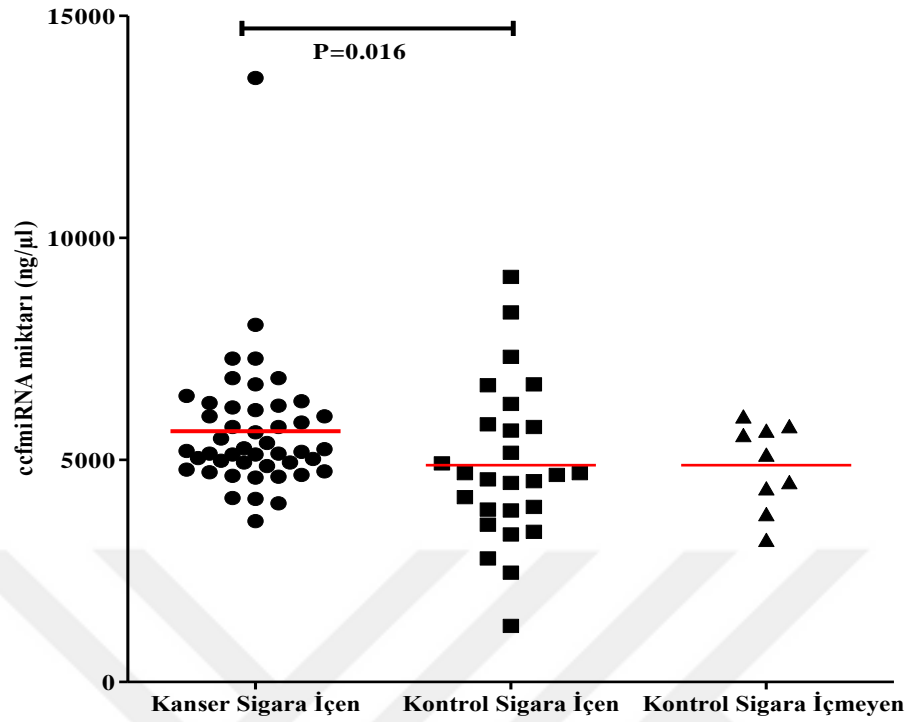


Şekil 9. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfRNA miktarı sigara kullanımına göre dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Sigara kullanımına bağlı olarak ccfmiRNA miktarı Tablo 10 ve Şekil 10 verilmiştir. Buna göre, sigara kullanan kanserli ve kontrol grubu bireyleri karşılaştırıldığında fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna göre kanserli bireylerde daha yüksek miktarda miRNA tespit edilmiştir. Diğer taraftan, kanserli sigara kullanan bireyler ve kontrol sigara kullanmayan bireyler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlam ifade eden bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 10. Sigara kullanımı bakımında ccfmiRNA miktar dağılımları

	Kanserli grup	Kontrol grubu	P* değeri
Sigara İçen	5646,5 ± 1516	4884,6 ± 1757	P=0,016
Sigara İçmeyen	-	972,1 ± 324	



Şekil 10. Kanserli ve sağlıklı bireylerde ölçülen ccfmiRNA miktarı sigara kullanımına göre dağılımları (Kırmızı çizgi, grup ortalamasını göstermektedir)

Sadece kanserli bireylerden elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki ilişki incelendiğinde, anlamlı ve pozitif ilişkiler olduğu gözlenmiştir. Spearman rho analizi sonuçlarına göre (Tablo 11), ccfDNA ile ccfmiRNA arasında pozitif ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark ölçülmüştür ($r=0,78$, $p=0,001$). Benzer şekilde, ccfmiRNA ile ccfRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($r=0,394$, $p=0,007$). Son olarak, ccfRNA ile ccfDNA arasında pozitif ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($r=0,388$, $p=0,008$).

Tablo 11. Larenks kanserli bireylerde elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki korelasyon katsayıları

	ccfmiRNA	ccfDNA	ccfRNA
ccfmiRNA	1,00		
ccfDNA	0,78**	1,00	
ccfRNA	0,39**	0,39**	1,00

** $p<0,01$

Sağlıklı bireylerde elde edilen nükleik asit miktarlarına Spearman rho korelasyon yöntemi uygulandığında, ccfmiRNA ile ccfDNA ($r=0,36$, $p=0,014$) ve

ccfRNA ($r=0,31$, $p=0,034$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görülmüştür.

Tablo 12. Sağlıklı bireylerde elde edilen nükleik asit miktarları arasındaki korelasyon katsayıları

	ccfmiRNA	ccfDNA	ccfRNA
ccfmiRNA	1,00		
ccfDNA	0,36*	1,00	
ccfRNA	0,31*	0,19	1,00

* $p<0,05$

Çalışmada, değerlendirilen parametrelere çoklu regresyon analizi uygulanarak birçok faktörün etkisi araştırılmıştır. Öncelikle, normal dağılım göstermeyen veriler, Kolmogrov Smironov testi ile tespit edilmiş, normal dağılmadığı belirlenen serbest nükleik asit miktarları log10 tabanına göre normalleştirilmiştir. ccfDNA bağımlı değişken olarak seçilmiş ve model araştırılması yapılmıştır. Bu modellerde yaş, tümör evresi, radyoterapi alma durumu, ek hastalık, tarımsal ilaçlara maruziyet ve köy hayatı faktörleri test edilmişlerdir. ccfDNA'nın bağımlı değişken olduğu durumlarda, modelde bulunan hiçbir değişken anlamlı bulunamamıştır. Larenks kanserli bireylerin hepsinin sigara içiyor olması ve erkek olması nedeni ile sigara kullanımı ve cinsiyet değerlendirilememiştir.

5.TARTIŞMA

Kanser hastalığı halen tedavisi tam olarak bulunamayan, tedavisi bireysel farklılıklara göre değişen ve maliyetli olan bir hastalıktır. Günümüzde, bazı kanser türleri için tedavi olanakları mevcuttur. Ancak, tedavi gerçekleşse bile yaşam süreleri çok uzun yılları bulamamaktadır. Üstelik bu süreçlerin uzaması ülke ekonomilerine ciddi yük getirmektedir. Tüm bu süreçler dikkate alındığında, kanseri önceden tahmin edebilen yeni arayışlar devam etmektedir. Böyle bir yaklaşım, önceden hastalığın bilinmesine yardımcı olacağı gibi erken teşhis avantajı ile hem tedavi şansı artmakta hem de ekonomik yükü azaltmaktadır. Bu bağlamda, yeni biyomarkerların varlığını araştırmak, farklı olanakları beraberinde getirecektir. Hem teşhis hem de tedavi için hedef belirlenmesine katkı sunacaktır. Biyomarker, hüresel, biyokimyasal veya moleküler değişimler sonucu oluşabilir. Ayrıca, kolaylıklar ve non-invasif bir şekilde ölçülebilmeli, doğrudan veya dolaylı olarak hastalıkla ilişkili olabilmelidir. Bu bağlamda, hücre dışına çıkmış ve vücut sıvılarında bulunan nükleik asitler sahip oldukları çeşitli özelliklerden dolayı biyomarker olarak değerlendirilmesi için uygun moleküllerdir. Bu özellikler şu şekilde sıralanabilir; 1) birçok vücut sıvısında bulunabilmektedirler, 2) vücut sıvılarının birçoğuna kolaylıkla ulaşılabilir, 3) eldesi çok kolay ve ekonomiktir, 4) miktar olarak birçok deneysel sürece yeter miktardadırlar, 5) miktarsal, genomik ve epigenomik değişimlerin araştırılması için uygun özelliktedirler. Tüm bu özellikler dikkate alındığında, tez çalışmasında, larenks kanserli bireylerin plazmalarında bulunan üç farklı nükleik asidi miktarsal olarak belirleyip, kanser olmayan sağlıklı bireyler ile karşılaştırarak istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı araştırılmıştır. Böylelikle hangi sirküler nükleik asidin larenks kanserli bireyler için biyomarker olabilecekleri analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında, larenks kanserli bireyler ile kanser olmayan, sağlıklı bireyler, karşılaştırıldığında, ccfDNA bakımından bir fark bulunamamıştır. Farklı kanser türleri ile yapılan çalışmalarda, genellikle ccfDNA miktarı kanserli bireylerde daha yüksek bulunmuştur. Mandel ve Mëtais'in 1940'lı yıllarda yaptıkları çalışmaları ile hasta ve sağlıklı bireylerde serbest dolaşımda bulunan nükleik asitlerin varlığı keşfedilmiştir (Mandel 1948). 2010'lu yıllarda plazmada bulunan hüresiz nükleik asitlerin, duyarlı hücreler tarafından farklı yollarla tümörjenezise ve metastaz

gelişimine katılması tezini araştırmış ve elde edilen sonuçlarla da ccfDNA'nın sağlıklı bireylerde kan dolaşımında bulunduğu kanıtlanmıştır (García-Olmo ve ark., 2010). Ancak ccfDNA miktarı ve karakteristiği incelendiği zaman kanser ve bazı kronik hastalıklarda plazma ve serum seviyelerinin yükseldiği gözlemlenmiştir. 1977 yılında sağlıklı bireylere kıyasla pankreas kanseri hastalarının daha yüksek bir ccfDNA seviyesine sahip olduğu ortaya konulmuştur (Leon ve ark., 1977). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar da bu bulguları desteklemiştir (Zhong ve ark., 2007).

Kamat ve arkadaşları over kanserinde plazma ccfDNA'nın arttığını, bu hastalarda tanı ve prognostik uygulamalar için yeni bir biyomarker olma potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur (Kamat ve ark., 2006). Umetani ve arkadaşları meme kanserinde sirküler haldeki serbest DNA'nın meme kanseri tümöründe bir belirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Umetani ve ark., 2006).

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunu inceleyen Nunes ve arkadaşları serumda serbest halde dolaşan tümör kaynaklı DNA miktarının fazla olmasının teşhis için kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Nunes ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda da kanser hastaları ve kontrol gruplarından elde edilen ccfDNA miktarları; kanserli grupta elde edilen ortalama ccfDNA miktarı 1137,9 ng/µl iken kontrol grubu için bu değer 1216,2 ng/µl olarak bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak aralarında bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

Tez çalışmasına en yakın çalışma, baş ve boyun kanserli bireylerden elde edilen plazmalar ile yapılan mutasyon araştırması çalışmasıdır. Çalışmada, plazma örneklerinde 5 farklı gene ait 65 mutasyon araştırılması yapılmıştır. Mutasyonların baş boyun kanserli bireylerin %42,2'sinde görüldüğü tespit edilmiştir (Perdomo ve ark., 2017). Şimdiye kadar larenks kanseri ile ilgili bir çalışma elde edilmediği için kıyaslama yapılamamaktadır. Ancak, genel eğilim, hasta gruplarında, özellikle kanserli bireylerde yüksek miktarda DNA'nın dolaşımında yer almasıdır. Çalışmaya dahil edilen birey sayısının az olması bu belirsizliğin sebeplerinden bir tanesi olabilir. Ancak, önerilen tez çalışmasında değerlendirilen birey sayısı ve koşullar dikkate alındığında dolaşımdaki serbest DNA'nın bir önemi olmadığı görülmüştür. Yapılan araştırmalarda, şimdiye kadar larenks kanserli bireylerde, konu ile ilgili araştırma

yapılmamıştır. Farklı kanser türleri için genel eğilim daha fazla miktarda ccfDNA olmasına karşın, tez çalışmasında yüksek bulunmamıştır.

CcfRNA ile yapılan çalışmalar ccfDNA ile yapılan çalışmalara göre oldukça azdır. Ancak serbest halde bulunan nükleik asitlerin dolaşıma geçmesi neredeyse aynı prensiplerle olmaktadır. Wong ve arkadaşları nazofarengeal karsinomun ccfRNA ile ilişkili olduğunu bulup teşhisinde yararlı olabileceğini ortaya koymuştur (Wong ve ark., 2006). Xuan ve arkadaşları larengeal yassı skuamöz hücreli kanser dokularında sirküler RNA'nın fonksiyonunu araştırmıştır (Xuan ve ark., 2016). Sirküler RNA'ların bu dokularda düzensiz halde olduğunu ve hsa_circRNA_100855 ve hsa_circRNA_104912'nin laringeal kanser için potansiyel biyomarkerler olabileceğini ortaya koymuşlardır (Xuan ve ark., 2016). Çalışmamızda, kanserli ve kontrol grubunda elde edilen ccfRNA miktarları; kanserli bireylerde daha az olduğu görülmüştür. Tez çalışmasında kanserli grupta ccfRNA miktarı ortalama 6221.7 ng/μl iken bu değer kontrol grubu için 7064.1 ng/μl olarak bulunmuştur. RNase vücut sıvılarında bulunan ve RNA'yı parçalama özelliği olan bir enzimdir. Daha önce kanserli hastaların kanlarında yüksek RNase miktarları tespit edilmiştir (Reddi ve Holland, 1976). Bu bağlamda, serbest dolaşan RNA miktarının azlığı, kanserli bireylerin kanlarındaki yüksek RNase enzimi ile ilişkili olabilir. Elde edilen anlamlı sonuçlar, serbest dolaşımdaki total RNA'nın larenks kanseri için önemli olabileceğini işaret etmektedir.

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, miRNA'nın kanser oluşum basamaklarında önemli görevler aldığı görülmüştür (Zhang ve ark., 2007). Bu da miRNA'ların kanser hastalıklarının teşhis ve tedavisinde ne kadar önemli olabileceğini ortaya koymaktadır. Kanser ve miRNA'ların ilişkisi incelendiğinde miRNA genlerinin % 52,5'inin, kansere bağlı genomik bölgelerde veya kırılğan bölgelerde olduğu görülmüştür (Calin ve ark., 2004). Yapılan ölçümlerde anormal microRNA ekspresyonu, farklı kanser türlerinde ortak bir özellik olarak görülmüştür (MoslemiNaeini ve Ardekani, 2009). Akciğer kanserinde miRNA'ların bazı türlerinde artma gözlenmiştir (Hayashita ve diğerleri 2005, Calin ve Croce, 2006). Meme kanserinde, tümör numunelerinde miR-21'in anlatımı artmış, diğer miRNA'larda da düzensizlik gözlenmiştir (Sempere ve ark., 2007). Mortalitesi oldukça yüksek olan kolorektal kanserinin miRNA'lar ile ilişkisi incelenmiştir. Faber

ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kolorektal kanserin prognozunu öngörülmesi ve spesifik aşamaların teşhisi için birçok miRNA ifadelerinin, mRNA'larla karşılaştırıldığında, biyomarkerler olarak daha yüksek bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Faber ve ark., 2009). Koichiro Saito ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada miR-196'nın laringeal kanseri teşhis etmede ve tedavi etmede önemli bir biyomarker olabileceğini ancak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu bildirmiştir (Saito ve ark., 2013). Çalışmamızda, kanserli ve kontrol gruplarında elde edilen ccfmiRNA; miktarı kanserli grupta 5646,5 ng/µl iken, bu değer kontrol grubunda 5028.3 olarak tespit edilmiştir. Kanserli grupta elde edilen ccfmiRNA miktarının kontrol grubundan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki grupta elde edilen verilere Mann Whitney U testi uygulandığında, ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu da bizim sonuçlarımızın diğer yapılan çalışmalar ile paralel doğrultuda ilerlediğini göstermektedir. Aynı zamanda total serbest miRNA'ların, larenks kanseri için de bir biyomarker olması olasıdır.

Larenks kanseri çevresel karsinojenlerden özellikle sigaradan etkilenmektedir. Agudelo ve arkadaşları sigara ve larenks kanserinin ilişkisini ortaya koymuştur. Brugere ve arkadaşları, Hashibe ve arkadaşları tütün ve alkol kullanımının larenks kanserine yakalanma riskini artırdığını birlikte kullanıldığında da bu riski sinerjistik olarak artırdığı tespit etmişlerdir (Brugere ve ark., 1986; Curado ve Hashibe 2009)). Ağır alkol ve sigara tüketiminin birlikte kullanımıyla kanserojen etkinin artmasının nedeninin biyolojik sinerjiyi düşüren bir etki olduğu düşünülmektedir (Talamini ve ark., 2002). Bu sinerjik etkiyle birlikte artışın %50'nin üzerinde olduğu düşünülmektedir (Flanders ve Rothman, 1982). Aralıklı sigara kullanımı veya sigarayı bırakmanın riski azalttığı gözlemlenmiştir (Zatonski ve ark., 1991). Tez çalışmasında, hasta grubunun hepsi sigara içmektedir. Kontrol grubu ise sigara içen ve içmeyen olarak ikiye ayrılmış ve karşılaştırma yapılmıştır. Temel olarak ccfDNA ve ccfRNA bakımından, sigara içen kanserli bireyler arasında fark bulunmamıştır. Ancak, sigara içen kanserli bireylerin plazmalarında, sigara içen kontrol grubundan daha fazla miRNA tespit edilmiştir. Özellikle miRNA bakımından, sigara içen larenks kanserli bireylerin sigara içen kontrol grubundan daha fazla olması, sigaranın dolaşımdaki miRNA miktarı bakımından önemini ortaya çıkarmaktadır.

Larenks kanseri ile ilgili yapılan istatistik çalışmalarında erkeklerde görülme oranı daha yüksek bulunmuştur. Çoğu ülkede erkeklerde görülme sıklığı daha yüksek olsa da kadın ve erkek arasındaki görülme sıklığı farkı giderek kapanmaktadır. 1947-1984 arasında yapılan bir çalışmada erkeklerde görülme oranı 100000'de 5,6-9,0, kadınlarda 100000'de %0,5-1,5'dir (DeRienzo ve ark., 1991). Polonya'da, 1960 - 1987 yıllarında bilinen hastalar arasında yapılan bir çalışmada, erkek - kadın görülme oranı 11.5' tir (Osmolski ve Kuś, 1992). Doğu Avusturya'da da kadınlarda görülme sıklığının giderek arttığı tespit edilmiştir (Swoboda ve Friedl, 1994). Hasta popülasyonu incelendiğinde erkeklerin çoğunda glottik kanserler geliştirirken, kadınların çoğunda supraglottik kanserlerin geliştiği tespit edilmiştir (Kokoska ve ark., 1995). Kadınlardaki iyileşmiş sağ kalım her ne kadar istatistiksel olarak anlamsız olsa da daha yüksektir ve nedenini tanıdaki erken yaş ile açıklanabilir (Stephenson ve ark., 1991). Sağlıklı bireylerde, ccfDNA (nükleer) miktarının cinsiyetler arasında farklı olduğu görülmüştür. Erkek ccfDNA miktarının kadınların miktarından daha yüksek olduğu görülmüştür (Meddeb ve ark., 2019). Çalışmamızda, hücre dışı DNA ve RNA açısından erkekler bakımından fark bulunmuştur. Kanserli erkeklerde daha az miktarda olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, kanserli erkeklerde elde edilen ccfmiRNA, kontrol bayanlardan daha yüksek bulunmuş ve anlamlı çıkmıştır. Kanserli bireylerin tamamen erkeklerden oluşmuş olması sonuçları değerlendirme bakımından zorluk çıkarsa da, genel eğilim olarak cinsiyet bakımından farklılıkların olabileceği öngörüler vardır. Bu bağlamda, daha fazla sayıda ve cinsiyet bakımından dengeli popülasyonlarda yapılmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, ccfmiRNA ile DNA ve ccfmiRNA ile RNA arasında pozitif ve anlamlı ilişki bulunmuştur. Diğer taraftan, ccfDNA ile ccfRNA arasında da pozitif ve anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir. Hasta gurubunda elde edilen bu sonuçlar, bu üç molekülün benzer mekanizmalar ile kana karıştıklarını fikrini doğrulamaktadır. Dolayısı ile kanser hastalarında dolaşıma katılan nükleik asitlerin benzer mekanizmalar ile dolaşıma katıldıkları söylenebilir. Konu ile ilgili daha önce benzer bir çalışma daha yapılmıştır.

Bu çalışmayı sınırlayan bazı temel faktörler vardır. Çalışmamız 46 kişilik kontrol ve 46 kişilik hasta grubuyla çalışılmıştır. Bu sayı böyle bir çalışmada

populasyon çeşitliliği taşımadığı için yeterli değildir. Larenks kanserli bireylerin hepsinin sigara içiyor olması ve erkek olması hasta populasyonunun darlığını gösterir. Bu nedenle de sigara kullanımı ve cinsiyetin araştırmada yer alan biyomarkerler üzerindeki etkisi etkili şekilde değerlendirilememiştir.

Dolaşımda serbest bulunan moleküllerin farklı ortaya çıkış nedenleri vardır. Bu moleküller sağlıklı bireylerde de kanda serbest halde bulunmaktadır. Apoptozis ve nekrozis de vücudun mekanizmalarından olup, bu moleküllerin dolaşımda serbest hale gelmesine neden olur. Çalışmada apoptozis ve nekrozis ölçülmediği için tümör kaynaklı serbest halde bulunan moleküllerin miktarı bilinmemektedir.

Tezde moleküllerin dolaşımda serbest halde bulunmasında etkili olup değerlendirilemeyen başka parametreler de RNase ve DNase enzimleridir. Bu enzimler RNA ve DNA'yı parçalamaktadır. Hasta ve sağlıklı bireylerde yer alan enzim miktarları değerlendirilemediği için kanda bulunan serbest moleküllerin enzimlerle parçalanma oranını bilememekteyiz. Örneğin çalışmamızda ccfDNA miktarının kanserli hastalarda kontrol grubuna göre daha az bulunma nedeni DNAase enziminin daha fazla bulunması olabilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1.Sonuç

Çalışmada yer alan 46 adet larenks kanserli birey 38 ve 81 yaşları arasındadır. Hasta grubunun yaş ortalaması 64.15 tir. Kontrol grubunda bulunan bireylerin ortalaması ise 50.39 olarak tespit edilmiştir. Sağlıklı bireyler 40 ile 64 yaş aralığındadır.

Larenks kanserli hasta grubunun %100' ü erkektir ve hepsinde sigara öyküsü bulunmaktadır. Kontrol grubunda bulunan bireylerin % 52,2 si erkektir ve 9 kişi sigara içmemektedir.

Çalışmada, kanserli gruptan elde edilen ortalama ccfDNA miktarı 1137.9 ng/μl iken kontrol grubu için bu değer 1216.2 ng/μl olarak bulunmuştur. Her iki grupta elde edilen değerler karşılaştırıldığında, istatistiki olarak fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Çalışmada, kanserli grupta ccfRNA miktarı ortalama 6221.7 ng/μl iken bu değer kontrol grubu için 7064.1 ng/μl olarak tespit edilmiştir. Her iki grubun ortalama değerleri karşılaştırıldığında aralarında kanserli bireylerdeki ccfRNA miktarının istatistiksel açıdan daha az olduğu ölçülmüştür ($p<0.05$).

Çalışmada, ccfmiRNA miktarı kanserli grupta 5646.5 ng/μl iken, bu değer kontrol grubunda 5028.3 olarak tespit edilmiştir. Kanserli grupta elde edilen ccfmiRNA miktarının kontrol grubundan yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki grupta elde edilen verilerin ortalamaları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan fark olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

Çalışmada, kanserli erkeğin ccfDNA miktarı 1137.9 ng/μl kontrol grubu 1391.17 ng/μl olup, istatistiksel değerlendirildiğinde daha az olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Benzer şekilde, kontrol kadınlar 1025.36 ng/μl olup karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$)

Ölçülen ccfRNA miktarının cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde kanserli erkek bireylerin ccfRNA miktarı 6221.74 ng/μl, kontrol grubu erkeklerinki 7611.25 ng/μl olup, anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($P<0.05$). Diğer taraftan, kontrol bayanlar 6467.27 olup kanserli erkek bireyler ile arasında bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

CcfmiRNA miktarının dağılımı cinsiyete göre incelendiğinde kanserli erkeklerde elde edilen miktar 5646 ng/ μ l, kontrol erkek 5408.5 ng/ μ l olup kanserli erkeklerde bu değer fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Ancak, kontrol grubu kadınların ortalaması 4613.63 ng/ μ l olup istatistiksel olarak kanserli erkeklerden elde edilen değerden daha düşüktür ($P<0.05$).

Sigara kullanımına bağlı olarak ccfDNA, ccfRNA ve ccfmiRNA miktarı incelenmiştir. ccfDNA miktarı, kanserli hasta grubunda, kontrol grubu sigara içen ve içmeyeneye göre kıyaslandığında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. CcfRNA miktarı; kanserli hasta grubu ve sigara kullanan ve kullanmayan kontrol grubunda yine bir fark gözlenmemiştir. CcfmiRNA miktarı; sigara kullanan kanserli grup ve sigara kullanan kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buna göre kanserli erkeklerde daha yüksek miktarda miRNA bulunmaktadır. Diğer taraftan, kanserli sigara kullanan ve kontrol sigara kullanmayan bireyler arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı değildir.

Kanserli bireylerden ölçülen nükleik asit miktarları arasındaki ilişki incelendiğinde, anlamlı ve pozitif ilişkiler olduğu gözlenmiştir. Spearman rho analizi sonuçlarına göre ccfDNA ile ccfmiRNA, ccfmiRNA ile ccfRNA ve ccfmiRNA ile ccfRNA arasında pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.

Sağlıklı bireylerde elde edilen nükleik asit miktarlarına Spearman rho korelasyon yöntemi uygulandığında; ccfmiRNA ile ccfDNA ve ccfRNA arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görülmüştür.

6.2. Öneri

Bu çalışmada ccfDNA, ccfRNA ve ccfmiRNA'nın larenks kanserinin birer biyomarkeri olup olmayacağı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ccfmiRNA ve ccfRNA larenks kanseri için biyomarker olma potansiyeli taşımaktadır. Ancak bu çalışma kısıtlı hasta popülasyonu ile yapıldığı için kadın larenks kanserli hasta ve sigara içmeyen hasta bulunmamaktadır. Daha sonra yapılacak çalışmalarda geniş bir hasta ve kontrol grubu popülasyonu ile planlanırsa daha güvenilir sonuçların elde edileceği öngörülmektedir. Elde edilen sonuçları, hastalığın takibi için kullanılabileceği söylenebilir. Bundan sonraki çalışmalara, sirküler kanda serbest dolaşan DNA ve RNA çeşitlerinde meydana gelen değişimlerin araştırılması önerilmektedir. Başta

DNA ve RNA modifikasyonları olmak üzere, bazı mutasyonlar ve gen anlatımları ilerki çalışmalarda araştırılabilir.



7.KAYNAKLAR

- Attar E, Dey S, Hablas A, Seifeldin IA, Ramadan M, Rozek LS ve Soliman AS. Head and neck cancer in a developing country: a population-based perspective across 8 years. *Oral oncology*. 2010; 46:591-596.
- Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Current opinion in pediatrics*. 2009; 21:243.
- Başerer N. Larenks malign neoplazmlarında tedavi. *Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi İstanbul*. 2002:667-683(Turgut Yay).
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A ve Fraumeni JF. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research*. 1988; 48:3282-3287.
- Bolognesi C, Morasso G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends in Food Science & Technology*. 2000; 11:182-187.
- Boring CC, Squires TS ve Tong T. *Cancer statistics, 1993*. CA: a cancer journal for clinicians. 1993; 43:7-26.
- Boyle P, Levin B, 2008. *World cancer report 2008*: IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW ve Pasquinelli AE. Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Molecular cell*. 2016; 64:320-333.
- Brugere J, Guenel P, Leclerc A ve Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer*. 1986; 57:391-395.
- Butt AN, Swaminathan R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137:236-242.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer*. 2006; 6:857.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F ve Negrini M. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101:2999-3004.
- Chalfie M, Horvitz HR ve Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell*. 1981; 24:59-69.
- Chang CP-Y, Chia R-H, Wu T-L, Tsao K-C, Sun C-F ve Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica chimica acta*. 2003; 327:95-101.

- Cırık Adnan Larenks Yassı Epitel Hücreli Kanserin, T regülatör (CD4+ CD25+ Foxp3highCD127dim) ve İmmün Sistem Diğer Alt Grup Hücrelerine Etkisi, 2009, Bakırköy DR. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, 57 sayfa, İstanbul, (Fatma Tülin Kayhan).
- Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*. 2009; 21:194-200.
- Curran A, Jonathan C ve Gullane P. Cancer of larynx, paranasal sinuses and temporal bone. *Essential otolaryngology*. 7th ed. Upper Saddle River: Appleton & Lange. 1999:549-72.
- Dağlı S, Dağlı U, Kurtaran H, Alkim C ve Sahin B. Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol*. 2004; 15:77-81.
- Deligezer U, Erten N, Akisik EE ve Dalay N. Circulating fragmented nucleosomal DNA and caspase-3 mRNA in patients with lymphoma and myeloma. *Experimental and molecular pathology*. 2006; 80:72-76.
- Derakhshan M. Apoptosis at a glance: Death or life? *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2007; 23:979.
- Derienzo DP, Greenberg SD ve Fraire AE. Carcinoma of the larynx: changing incidence in women. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 1991; 117:681-684.
- Di Leva G, Garofalo M ve Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014; 9:287-314.
- Dosemeci M, Gokmen I, Unsal M, Hayes RB ve Blair A. Tobacco, alcohol use, and risks of laryngeal and lung cancer by subsite and histologic type in Turkey. *Cancer Causes & Control*. 1997; 8:729-737.
- Du J, Chen G, Vlantis AC, Chan P, Tsang R ve Van Hasselt C. Resistance to apoptosis of HPV 16-infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer letters*. 2004; 205:81-88.
- Engin K, Erişen L, 2003. *Baş-boyun kanserleri*: Nobel.
- Estève J, Riboli E, Páquignot G, Terracini B, Merletti F, Crosignani P, Ascunce N, Zubiri L, Blanchet F ve Raymond L. Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multi-center study in southwestern Europe. *Cancer Causes & Control*. 1996; 7:240-252.
- Faber C, Kirchner T ve Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Archiv*. 2009; 454:359-367.
- Falk RT, Pickle LW, Brown LM, Mason TJ, Buffler PA ve Fraumeni JF. Effect of smoking and alcohol consumption on laryngeal cancer risk in coastal Texas. *Cancer research*. 1989; 49:4024-4029.

- Flanders WD ve Rothman KJ. Interaction of alcohol and tobacco in laryngeal cancer. *American Journal of Epidemiology*. 1982; 115:371-379.
- Flint PW, Haughey BH, Niparko JK, Richardson MA, Lund VJ, Robbins KT, Lesperance MM ve Thomas JR, 2010. *Cummings Otolaryngology-Head and Neck Surgery E-Book: Head and Neck Surgery, 3-Volume Set*: Elsevier Health Sciences.
- Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D ve La Vecchia C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer research*. 1990; 50:6502-6507.
- Freedman JE, Gerstein M, Mick E, Rozowsky J, Levy D, Kitchen R, Das S, Shah R, Danielson K ve Beaulieu L. Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. *Nature communications*. 2016; 7:11106.
- Fu G, Brkić J, Hayder H ve Peng C. MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14:5519-5544.
- Funaki NO, Tanaka J, Kasamatsu T, Ohshio G, Hosotani R, Okino T ve Imamura M. Identification of carcinoembryonic antigen mRNA in circulating peripheral blood of pancreatic carcinoma and gastric carcinoma patients. *Life sciences*. 1996; 59:2187-2199.
- Gahan PB, 2016. *Circulating nucleic acids in early diagnosis, prognosis and treatment monitoring*: Springer.
- Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Levi F, Negri E ve La Vecchia C. Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional, and hormonal factors. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2003; 12:514-517.
- Gao X, Fisher SG, Mohideen N ve Emami B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2003; 56:427-435.
- García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM ve García-Olmo D. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer research*. 2010; 70:560-567.
- Garzon R, Calin GA ve Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*. 2009; 60:167-179.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM ve Sorenson GD. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*. 1998; 17:89-97.

- Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009; 41:87-95.
- Haydaroglu A, Bölükbaşı Y ve Özşaran Z. Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2007; 22:22-28.
- Hayes J, Peruzzi PP ve Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in molecular medicine*. 2014; 20:460-469.
- Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW ve Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137:162-170.
- Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A ve Salih HR. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006; 55:1584-1589.
- Iarc. IARC classifies radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans. Press release. 2011; 208.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D ve Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*. 2001; 61:1659-1665.
- Kahn HA. The Dorn study of smoking and mortality among US veterans: report on eight and one-half years of observation. 1966.
- Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, Dang D, Han LY, Godwin A, Karlan BY, Simpson JL, Gershenson DM ve Coleman RL. Plasma cell - free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer*. 2010; 116:1918-1925.
- Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, Baldwin M, Han LY, Lin YG, Merritt WM, Landen CN, Lu C ve Gershenson DM. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer biology & therapy*. 2006; 5:1369-1374.
- Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, Frimannson DO, Bronsart L, Wang A, Sylvester MD, Schmidt TL, Kaspar RL ve Butte MJ. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112:E1433-E1442.
- Kanwal R, Gupta K ve Gupta S, 2015. Cancer epigenetics: an introduction. *Cancer Epigenetics*. Springer, 3-25.
- Kaya S. Larenks Hastalıkları. Ed Çevik İ, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 2002.
- Koç C, 2013. *Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş-boyun cerrahisi*: Güneş Tıp Kitabevleri.
- Kohler C, Barekati Z, Radpour R ve Zhong XY. Cell-free DNA in the circulation as a potential cancer biomarker. *Anticancer research*. 2011; 31:2623-2628.

- Kokoska MS, Piccirillo JF ve Haughey BH. Gender differences in cancer of the larynx. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 1995; 104:419-424.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW ve Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clinical cancer research*. 1999; 5:1961-1965.
- Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Vasyl'f C ve Pogribny IP. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clinical epigenetics*. 2011; 2:171.
- La Vecchia C, Altieri A ve Tavani A. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *European Journal of Nutrition*. 2001; 40:261-267.
- Lajtman Z, Nosso D, Romić Z, Trutin-Ostović K ve Krpan D. Laryngeal cancer and blood selenium levels. *European archives of oto-rhino-laryngology*. 1994; 251:170-172.
- Lee RC, Feinbaum RL ve Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*. 1993; 75:843-854.
- Leon S, Shapiro B, Sklaroff D ve Yaros M. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*. 1977; 37:646-650.
- Lipkin A, Miller RH ve Woodson GE. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, and larynx in young adults. *The Laryngoscope*. 1985; 95:790-793.
- Lo K-W, Lo YD, Leung S-F, Tsang Y-S, Chan LY, Johnson PJ, Hjelm NM, Lee JC ve Huang DP. Analysis of cell-free Epstein-Barr virus-associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical chemistry*. 1999; 45:1292-1294.
- Lo YD, Chiu RW. The biology and diagnostic applications of plasma RNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004; 1022:135-139.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH ve Ferrando AA. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*. 2005; 435:834.
- Major T, Szarka K, Sziklai I, Gergely L ve Czegledy J. The characteristics of human papillomavirus DNA in head and neck cancers and papillomas. *Journal of clinical pathology*. 2005; 58:51-55.
- Mandel P. M étais, P.(1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Seances Soc. Biol. Ses Fil*. 142:241-243.
- Meddeb R, Dache ZaA, Thezenas S, Otandault A, Tanos R, Pastor B, Sanchez C, Azzi J, Tusch G ve Azan S. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific reports*. 2019; 9:5220.

- Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Bugel I ve Leclerc A. Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *European journal of cancer prevention*. 2004; 13:165-172.
- Naeini MM, Ardekani AM. Noncoding RNAs and cancer. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2009 Jul-Sep; 1(2): 55–70.
- Myers EN, Alvi A. Management of carcinoma of the supraglottic larynx: evolution, current concepts, and future trends. *The Laryngoscope*. 1996; 106:559-567.
- Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S ve Calin GA. MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases. *Nature Reviews Cancer*. 2009; 9:293.
- Nunes DN, Kowalski LP ve Simpson AJ. Circulating tumor - derived DNA may permit the early diagnosis of head and neck squamous cell carcinomas. *International journal of cancer*. 2001; 92:214-219.
- Osmolski A, Kuś J. Clinical course of laryngeal cancer in relation to sex. *Otolaryngologia polska= The Polish otolaryngology*. 1992; 46:117-126.
- Paranjape T, Slack F ve Weidhaas J. MicroRNAs: tools for cancer diagnostics. *Gut*. 2009; 58:1546-1554.
- Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha RS, Malakar AK ve Chakraborty S. Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of cellular physiology*. 2018; 233:2007-2018.
- Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA—a new paradigm in genetic behaviour. *Clinica chimica acta*. 2011; 412:806-811.
- Pietrasz D, Pecuchet N, Fabre E, Blons H, Chevalier L, Taly V, Laurent-Puig P ve Bachet J-B. What future for circulating tumor DNA? Current data and prospects in colorectal, non-small cell lung and pancreatic cancers. *Bulletin du cancer*. 2016; 103:55-65.
- Rapisuwon S, Vietsch EE ve Wellstein A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. *Computational and structural biotechnology journal*. 2016; 14:211-222.
- Reddi K, Holland JF. Elevated serum ribonuclease in patients with pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1976; 73:2308-2310.
- Rosai J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology Vol1*. 2004.
- Saito K, Inagaki K, Kamimoto T, Ito Y, Sugita T, Nakajo S, Hirasawa A, Iwamaru A, Ishikura T ve Hanaoka H. MicroRNA-196a is a putative diagnostic biomarker and therapeutic target for laryngeal cancer. *PloS one*. 2013; 8:e71480.

- Sayılğan 2006 T. Larenks Skuamoz Hücreli Karsinomunda COX-2 Ekspresyonunun Önemi, 2006 İstanbul Ok Meydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Bölümü, Uzmanlık Tezi, 78 sayfa, İstanbul (Deniz Özcan).
- Schwarzenbach H, Hoon DS ve Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*. 2011; 11:426.
- Sempere LF, Christensen M, Silahtaroglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S ve Cole CN. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer research*. 2007; 67:11612-11620.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM ve Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. 1983; 51:2116-2120.
- Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ ve Bhadra U. MicroRNAs—micro in size but macro in function. *The FEBS journal*. 2008; 275:4929-4944.
- Smith EM, Summersgill KF, McCulloch T, Allen J, Turek LP, Hoffman HT ve Haugen TH. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*. 2000; 109:1069-1076.
- Stephenson WT, Barnes DE ve Holmes FF. Gender influences subsite of origin of laryngeal carcinoma. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery*. 1991; 117:774-778.
- Swaminathan R, Butt AN. Circulating nucleic acids in plasma and serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1075:1-9.
- Swoboda H, Friedl H-P. Mortality from cancer of the head and neck, lung and esophagus in eastern Austria between 1960 and 1989. *European archives of oto-rhino-laryngology*. 1994; 251:52-56.
- Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of clinical virology*. 2005; 32:59-66.
- Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S ve Barzan L. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer causes & control*. 2002; 13:957-964.
- Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Rykova EY, Permyakova VI, Vlassov VV ve Laktionov PP. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clinical chemistry*. 2005; 51:1317-1319.
- Théry C, Ostrowski M ve Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature reviews immunology*. 2009; 9:581.
- To-Figueras J, Gené M, Gómez-Catalán J, Piqué E, Borrego N, Caballero M, Cruellas F, Raya A, Dicenta M ve Corbella J. Microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-

- transferase polymorphisms in relation to laryngeal carcinoma risk. *Cancer letters*. 2002; 187:95-101.
- Tomek MS, Mcguirt WF. Second head and neck cancers and tobacco usage. *American journal of otolaryngology*. 2003; 24:24-27.
- Tong Y-K, Lo YD. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica chimica acta*. 2006; 363:187-196.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet - Tieulent J ve Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015; 65:87-108.
- Tüfekci KU, Öner MG, Meuwissen RLJ ve Genç Ş, 2014. The role of microRNAs in human diseases. *miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis*. Springer, 33-50.
- Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S ve Hoon DS. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *Journal of clinical oncology*. 2006; 24:4270-4276.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ ve Lövall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007; 9:654.
- Valleron W, Laprevotte E, Gautier E, Quelen C, Demur C, Delabesse E, Agirre X, Prosper F, Kiss T ve Brousset P. Specific small nucleolar RNA expression profiles in acute leukemia. *Leukemia*. 2012; 26:2052.
- Van Der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1137:18-26.
- Vasudevan S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2012; 3:311-330.
- Wagner J. Free DNA—new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? *Biochimica medica: Biochimica medica*. 2012; 22:24-38.
- Wang BG, Huang H-Y, Chen Y-C, Bristow RE, Kassaei K, Cheng C-C, Roden R, Sokoll LJ, Chan DW ve Shih I-M. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer research*. 2003; 63:3966-3968.
- Wang J, Chen J ve Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *Journal of cellular physiology*. 2016; 231:25-30.
- Wong BC, Chan KA, Chan AT, Leung S-F, Chan LY, Chow KC ve Lo YD. Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clinical cancer research*. 2006; 12:2512-2516.
- Wünsch V. The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *São Paulo Medical Journal*. 2004; 122:188-194.

- Xuan L, Qu L, Zhou H, Wang P, Yu H, Wu T, Wang X, Li Q, Tian L ve Liu M. Circular RNA: a novel biomarker for progressive laryngeal cancer. *American journal of translational research*. 2016; 8:932.
- Yang H, Liu V, Tsang P, Yip A, Tam K, Wong L, Ng T ve Ngan H. Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2004; 14:903-910.
- Zachariah R, Schmid S, Radpour R, Buerki N, Fan AX-C, Hahn S, Holzgreve W ve Zhong XY. Circulating cell-free DNA as a potential biomarker for minimal and mild endometriosis. *Reproductive biomedicine online*. 2009; 18:407-411.
- Zatonski W, Becher H, Lissowska J ve Wahrendorf J. Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: a population-based case-control study. *Cancer Causes & Control*. 1991; 2:3-10.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP ve Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*. 2007; 302:1-12.
- Zhong XY, Ladewig A, Schmid S, Wight E, Hahn S ve Holzgreve W. Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2007; 276:327-331.



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 18920478-050.04.04-E.1900024192
Konu : Başvuru İncelemesi (Doç. Dr.
Akın ÇAYIR)

12/02/2019

Sayın Doç. Dr. Akın ÇAYIR

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Hücre Dışı Sirküler Moleküllerin Larenks Kanserinde Araştırılması" başlıklı 2011-KAEK-27/2018-E.1800185667 no'lu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 06.02.2019 tarih ve 03-07 no'lu kararı aşağıdadır.
Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi: 06.02.2019
Karar No: 2019-03

Karar07)2011-KAEK-27/2018-E.1800185667 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsü Doç. Dr. Akın ÇAYIR'ın çalışması Etik Kurul tarafından değerlendirilmiş olup; yapılan oylamada "ETİK KURUL ONAYINI ALIR" kararı verilmiştir.

e-İmzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

[Bilgi Doğrulamak İçin: https://bys.comu.edu.tr/ERMS/Resmi/Confirmasyon/PagelIndex_adresinden_4P4H9C_koda_gizlenik_bolgeyi_ogretilebilirizine](https://bys.comu.edu.tr/ERMS/Resmi/Confirmasyon/PagelIndex_adresinden_4P4H9C_koda_gizlenik_bolgeyi_ogretilebilirizine)

Adres : Onsekiz Mart Üniversitesi Tercişli Yerleşkesi
Çanakkale
e-posta : bilisiznet@comu.edu.tr

Bilgi için İrtibat : Fatma Otman - Sekreter
Telefon :
Belgeçer No :
İnternet Adresi :



1990024192 numaralı belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince Öztürk Özdemir tarafından 12.02.2019 tarihinde gizlenik bölge ile imzalanmıştır.

SPİRALLİ TEZ KONTROL FORMU

	Evet	Hayır
1) Amblem renkli ve 2x2 cm boyutunda olmalıdır.		
2) Kapakta sadece başlık bold ve 14 punto, diğer yazılar normal renkte ve 12 punto yazılmalıdır.		
3) Tez savunma sınavında kabul edilmiş tezler için, tezin sırtı tez yazım kılavuzuna uygun olarak düzenlenmiş olmalıdır.		
4) Kabul edilmiş tez konusu ile tezin baş sayfasındaki tez konusu aynı olmalıdır.		
5) Beyan eksiksiz ve imzalı olarak Tez Yazım Kılavuzundaki gibi konmalıdır.		
6) Özet ve Summary 250'şer kelimeyi aşmamalıdır. (1 sayfa)		
7) Anahtar kelimeler (en fazla) 5 adet olmalıdır.		
8) İngilizce özetin başında konu başlığı yazılmalıdır.		
9) Metin ve kaynakların tümü 1,5 aralıklı olmalıdır.		
10) Tezde yazım karakteri olarak "Times New Roman" kullanılmalıdır.		
11) Web sayfa kaynakları metin içinde de geçmelidir (parantez içinde güncelleme tarihi ile birlikte). Kaynaklar bölümünde de cümlelerin en sonunda Erişim adresi ve Erişim tarihi sırasıyla verilmelidir.		
12) Çalışmanın Etik Kurul onayı, varsa kurum onayı tezin en arkasına konmalıdır.		

Tarih: ... / ... / 20...	Tarih: ... / ... / 20...
Öğrenci Adı ve Soyadı,	Danışmanın Adı ve Soyadı,
İmza	İmza

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ SİRALI/CİTLİ TEZ YAZIM KONTROL LİSTESİ

KONTROL BAŞLIĞI	ÖĞRENCİ	DANIŞMAN
Tez yazımında kullanılan yazı tipi	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfa kenar boşlukları	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İç kapak sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Onay sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Beyan sayfası içeriği ve düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İçindekiler sayfası düzeni	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Teşekkür sayfası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Türkçe özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
İngilizce özet	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Simgeler ve kısaltmalar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekiller dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tablolar dizini	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin ön sayfalarının sıralaması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ön sayfaların numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sayfalarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Başlıklarının numaralandırılması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Şekil, resim ve tablo numaralandırması	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Yöntem ve Gereç	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Bulgular	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tartışma	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Sonuç ve Öneriler	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kaynaklar	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Atıflar (alıntı ve göndermeler)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Ekler (etik kurul onayı, vs)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tez planı	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Dil (anlatım, yazım –imla)	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Kâğıt ve baskı özelliği	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tezin son şeklinin elektronik kopyası	<input type="checkbox"/> UYGUN	<input type="checkbox"/> UYGUN
Tarih: ... / ... / 20...	Tarih: ... / ... / 20...	
Öğrenci Adı ve Soyadı,	Danışmanın Adı ve Soyadı,	
İmza	İmza	

Ek.4. Özgeçmiş Kişisel Bilgiler

Adı	Başak			Soyadı	YAVUZ
Doğum Yeri	Seyhan	Uyruğu	T.C.	Doğum Tarihi	11.08.1992
E-mail	Basakyavuz1993@gmail.com			Tel	05373394436

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2019
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2015

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Eczacı	Biga Devlet Hastanesi	2015 -

Yabancı Dil Sınav Notu#

KPDS	ÜDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English