T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LARİNKS KANSERİ'NDE ANJİYOGENEZ, PROLİFERASYON, HÜCRE ADEZYONU VE İNVAZYONLA İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN HASTALIK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr.Ahmet Erim Pamuk

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2021

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LARİNKS KANSERİ'NDE ANJİYOGENEZ, PROLİFERASYON, HÜCRE ADEZYONU VE İNVAZYONLA İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN HASTALIK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Ahmet Erim Pamuk

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN

ANKARA

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LARİNKS KANSERİ'NDE ANJİYOGENEZ, PROLİFERASYON, HÜCRE ADEZYONU VE İNVAZYONLA İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN HASTALIK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ahmet Erim Pamuk

Doç. Dr. Gürcan Günaydın

Bu tez çalışması 16.02.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	*Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel* *Gazi Üniversitesi*
Tez Danışmanı:	*Doç. Dr. Gürcan Günaydın* *Hacettepe Üniversitesi*
Üye:	*Prof. Dr. Nilda Sütay Süslü* *Hacettepe Üniversitesi*
Üye:	*Prof. Dr. A. Lale Doğan* *Hacettepe Üniversitesi*
Üye:	*Doç. Dr. Hande Canpınar* *Hacettepe Üniversitesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

05 Mart 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü V.

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan ***"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. [(1)]
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ...ay ertelenmiştir. [(2)]
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. [(3)]

03/03/2021

Ahmet Erim PAMUK

[i1] *"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*

*(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

*(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

*(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

***** Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.***

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Ahmet Erim Pamuk

TEŞEKKÜR

"Çalışmak her şeyi fetheder."

VIRGILIUS

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, başta Anabilim Dalı başkanı Prof.Dr.Lale DOĞAN olmak üzere tüm Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Değerli fikirleri ve bilimsel katkılarıyla her zaman bana destek olan sorumlu tez danışmanım Doç.Dr.Gürcan GÜNAYDIN'a,

Bana her zaman olan desteği ve değerli fikirleriyle yol gösteren Hacettepe Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nilda SÜSLÜ'ye,

Tezin her aşamasında verdiği emek, gösterdiği sabır ve yardımları için Dr. Emre GEDİK'e,

Tez verilerinin toplanmasında değerli yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı asistanlarına,

Bana koşulsuz desteği ve kendilerine ayıramadığım zaman için gösterdiği sabır için değerli eşim Dr. Gözde Pamuk'a ve hayatıma anlam katan oğlum Kuzey'e

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Pamuk, A. E., Larinks Kanseri'nde Anjiyogenez, Proliferasyon, Hücre Adezyonu ve İnvazyonla İlişkili Biyobelirteçlerin Hastalık Özellikleri ile İlişkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Larinks skuamoz hücreli karsinomu (LSCC) sık görülen bir baş boyun kanseri tipidir. Tanı ve tedavi seçeneklerindeki yıllar içerisinde ilerlemeye rağmen sağkalımda anlamlı artış elde edilememiştir ve halen ciddi bir morbidite ve mortalite kaynağıdır. Bu durum hastalık tanı ve takibinde kullanılabilecek güvenilir biyobelirteçlerin bulunması ihtiyacını doğurmaktadır. Bu çalışmaya Mayıs 2018 ile Şubat 2020 arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda primer LSCC tanısı alan 60 hasta ve 20 adet sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Bireylerin serum örneklerinde Angiogenin, Endoglin, VEGF, sVEGFR1, VEGFR2, IGFBP-3 ve Osteopontin düzeyleri ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Tüm hastalar prospektif olarak takip edilmiştir ve biyobelirteç düzeyleri, klinik parametreler, sağkalım ve prognoz açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilenlerin 76'sı erkek 4'ü kadındır. Genel yaş ortalaması 62,86 ± 9,6'dır. Ortalama takip süresi 19,5 ± 9,7 aydır. Hasta grubunda Osteopontin, IGFBP3, VEGF, sVEGFR1, VEGFR2 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,01$ ve $p<0,01$). Herhangi bir biyobelirteç ile T evresi, lenf nodu metastazı, uzak metastaz ve klinik evre arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir. Osteopontin ve sVEGFR-1 düzeyleri lokal rekürrensi olan vakalarda anlamlı olarak yüksektir ($p=0,034$ ve $p=0,038$). En yüksek sensitivite ve spesifite oranı %81,4 duyarlılık ve %80 özgüllük ile IGFBP3'de izlenmiştir ($p<0,001$). Sağkalım analizi yapıldığında 1 yıllık ve 2 yıllık sağkalım oranı sırasıyla %92 ve %85,5 olarak bulunmuştur. sVEGFR-1'in eşik değer üstü değerleri VEGFR-2'nin ise median değer altındaki değerleri sağkalım açısından kötü prognostik etkiye sahiptir. Sonuç olarak, araştırılan biyobelirteçlerin bazılarının düzeyleri larinks kanserinde normal popülasyona göre artmış olsa da tek başına tanı koydurucu değildir. Sağkalımve rekürrens değerlendirilmesinde Osteopontin, sVEGFR-1 ve VEGFR2 üzerine daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler : larinks kanseri, angiogenin, endoglin, vegf, svegfr-1, vegfr2, osteopontin, biyobelirteç

ABSTRACT

Pamuk, A. E., An investigation of clinical parameters and biomarkers associated with angiogenesis, proliferation, cell adhesion and invasion in laryngeal carcinoma, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Master Thesis in Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2021. Larynx squamous cell carcinoma (LSCC) is a commonly seen subtype of head and neck cancer. Despite the advances in diagnosis and treatment options through the years, there has been no improvement in the survival rates and larynx cancer yet remains as a significant cause of morbidity and mortality. This has necessitated the use of reliable biomarkers in the diagnosis of the disease and follow up. This study included 60 primary LSCC patients who were diagnosed at Hacettepe Universtiy Medical Faculty Department of Otorhinolaryngology between May 2018 and February 2020 and 20 healthy volunteers. Angiogenin, Endoglin, VEGF, sVEGFR1, VEGFR2, IGFBP-3 and Osteopontin levels were investigated with ELISA method in the serum samples of all participants. All patients were prospectively followed up and the biomarker levels were compared for clinical parameters, survival and prognosis. In all participants, 76 were male and 4 were female. Mean age was 62.86 ± 9.6 years. Mean follow up time was 19.5 ± 9.7 months. Osteopontin, IGFBP3, VEGF, sVEGFR1, VEGFR2 levels were higher in patient group ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.01$ and $p<0.01$, respectively). There was no association with T stage, lymph node metastasis, distant metastasis and clinical grade in any of the biomarkers. Osteopontin and sVEGFR-1 levels were significantly higher in patients with local recurrence ($p=0.034$ and $p=0.038$). IGFBP3 had the highest sensitivity (81,4%) and specifity (80%) rates. 1-year and 2-year survival rates were 92% and 85,5% respectively. Patients whose sVEGFR-1 values were higher than the cut-off value and whose VEGFR-2 values were lower than the median value had worse prognosis. In conclusion, despite the significant differences in some biomarkers in the patient group compared to healthy volunteers, it is not enough to be precisely diagnostic. There should be more studies on Osteopontin, sVEGFR-1 and VEGFR2 for the evaluation of survival and recurrence.

Keywords : larynx carcinoma, angiogenin, endoglin, vegf, svegfr-1, vegfr2, osteopontin, biomarker

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLOLAR	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1 Larinks skuamoz hücreli kanseri	2
2.2 Anjiyogenez	6
3.GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1 Hasta ve Gönüllü Bireylerden Kan Örnekleri Toplanması	14
3.2 Kan Örneklerinin ELISA Yöntemi ile Analiz Edilmesi	14
3.3 İstatistiksel Analizler	16
3.4 Veri Toplama Formu	17
4.BULGULAR	18
5.TARTIŞMA	28
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	36
7.KAYNAKLAR	38
8.EKLER	49

8.1 Etik Kurul Onayı

8.2 Turnitin Raporu

8.3 Tez Orjinallik Belgesi

SİMGELER ve KISALTMALAR

AKT	Protein kinaz B
ANG	Angiogenin
ANOVA	Varyans analizi
bFGF	Basit fibroblast büyüme faktörü
CD105	*Cluster of differentiation 105*
CD31	*Cluster of differentiation 31*
CD34	*Cluster of differentiation 34*
CD44	*Cluster of differentiation 44*
CD44v	*Cluster of differentiation 44 variant*
CD44v6	*Cluster of differentiation 44 variant 6*
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELISA	Enzime bağlı immünsorbent deneyi
ENI	Ekstranodal invazyon
ERK1	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz-1
ERK2	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz-2
HIF-1	Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HRP	Yabanturpu peroksidazı
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP3	İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü
kDa	Kilo dalton
KT	Kemoterapi

LSCC	Larinks yassı hücreli karsinomu
MDY	Mikrodamar yoğunluğu*)*
mRNA	Mesajcıribonükleik asit
Nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
OPN	Osteopontin
PI3K	Fosfotidilinozitol 3-kinaz
PIGF	Plasental büyüme faktörü
ROC	Alıcı işletim karakteristiği
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT	Radyoterapi
SIBLING	Küçük integrin bağlayan ligand n-bağlı glikoprotein
sVEGFR-1	Çözünebilen vasküler endotelyal büyüme faktörü *reseptörü-1*
TGF-ß	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
VEGF-B	Vasküler endotelyal büyüme faktörü B
VEGF-C	Vasküler endotelyal büyüme faktörü C
VEGF-D	Vasküler endotelyal büyüme faktörü D
VEGF-E	Vasküler endotelyal büyüme faktörü E
VEGFR-1	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-1
VEGFR-2	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2

VEGFR-3 Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-3

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
4.1	Osteopontin düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	19
4.2	Endoglin düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	19
4.3	Angiogenin düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	20
4.4	IGFBP3 düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	20
4.5	sVEGFR1 düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	21
4.6	VEGFR2 düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	21
4.7	VEGF düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı	22
4.8	Çalışılan biyobelirteçlerin ROC eğrileri	25
4.9	sVEGFR-1 için eşik değer üstü ve altındaki hastalarınsağkalım oranı	26
4.10	VEGFR2 median değer üstü ve altındaki hastaların sağkalım olasılığı	27

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1	American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8. Edisyon larinks kanseri TNM evrelemesi	3-5
2.2	American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8. Edisyon larinks kanseri hastalık evrelemesi	5
4.1	Biyobelirteç adayı moleküllerin hasta grubu ve kontrol grubundaki düzeylerinin karşılaştırılması	18
4.2	ROC analizi sonrası bulunan eşik değerler ve sensitivite/spesifite değerleri	25

1.GİRİŞ

Larinks yassı (skuamoz)hücreli karsinomu (LSCC) en sık görülen baş boyun SCC alt tiplerinden biri olup ABD'de yılda 4000 hastanın ölümüne yol açmaktadır (1). Her yıl dünyada 160,000 yeni LSCC vakası görülmekte ve erkeklerdeki tüm tümörlerin %2,5'ini larinks kanseri oluşturmaktadır (2).Diğer birçok kanser türünde 1960'lı yıllardan itibaren sağkalımda ciddi artış meydana gelse de larinks SCC sağkalım oranlarında son 50 yılda anlamlı artış elde edilememiştir (3).Hastalığın prognozunun kötü olması temel olarak hastaların ileri evrede prezente olmasından ve/veya lokal nükslerden kaynaklanmaktadır.

Neoplastik anjiyogenez kanser gelişiminde hayati bir basamaktır ve tümör büyümesi içingereklidir. Anjiyogenez olmadan tümör, difüzyonla en fazla 1-2 mm boyuta ulaşabilmektedir. Tümör ve endotelial hücrelerden üretilen anjiyogenik faktörler sayesinde tümör büyümesi ve metastatik potansiyeli artmaktadır. Pro-anjiyogenik faktörler anti-anjiogenik faktörler tarafından dengelenemeyip net etki anjiyogenez lehine kayarsa "anjiyogenik dönüşüm *(switch)"* durumu gelişir ve yeni damar oluşumu tetiklenir. Kanser esnasında aktive olan anjiyogenik yolaklarda görev alan proteinlerin biyobelirteç adayı olarak test edilmesi hem hastalık tanısında hem de hastalık seyrini takip etmekte iyi bir hedef gibi görünmektedir. Ancak geniş dinamik değer aralıkları ve değerleri etkileyen kompleks mekanizmalar nedeniyle, verimli bir biyobelirteç olarak kullanılmalarında günümüze kadar tam bir başarı sağlanamamıştır.

Bu çalışma ile larinks kanseri esnasında anjiyogenikyolaklarda görev alan moleküllerin bazılarının düzeyleri tespit edilecek, sağlıklı bireylerlefarkları karşılaştırılacak ve çeşitli kliniko-patolojik parametrelerle ve sağkalımla ilişkisi araştırılacaktır. Bir veya birkaç molekülde bulunabilecek olası anlamlı değişimler sonucunda, ileride yapılacak destekleyici çalışmalarla birlikte, bu moleküllerin klinikte güvenilir biyobelirteçler olarak kullanılabilmesine destek olunması hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Larinks Skuamoz Hücreli Kanseri

Baş-boyun skuamoz hücreli karsinomları, diğer kanserler içinde 6. en sık görülen kanser tipidir (4, 5). Her yıl 500,000 yeni baş-boyun kanseri vakası görülmektedir ve bunların 160,000'i larinks kaynaklıdır (2, 6). Larinks skuamoz hücreli karsinomu (LSCC), larinks dokusunun döşeyici mukozal yüzey epitelinden köken alır. Larinks malign tümörlerinin %95'i çok katlı yassı epitelden gelişen LSCC'dir (7). En önemli risk faktörleri karsinojenlere (alkol ve tütün) maruziyettir.Özellikle alkol ve sigaranın larinks kanserinde sinerjistik etkisi olduğu bilinmektedir. HPV enfeksiyonu larinks kanseri olanların yaklaşık %25'inde görülürken, larinks karsinogenezindeki rolü diğer bazı baş-boyun kanserlerindeki (örn. orofarinks) gibi net değildir (8).

Genel olarak kanser gelişimi, oluşan genetik mutasyonların akümülasyonu ile oluşan malign hücrelerin klonal popülasyonunun seçilimi sonucu ortaya çıkar(9). Fearon ve Vogelstein tümörigenez için 3 temel ilke belirlemişlerdir: Proto-onkogenlerin aktivasyonu ve tumor supresör genlerin inaktivasyonu gereklidir, malign fenotip gelişimi için tanımlanmış sıra ile genetik değişimler olmalıdır, genetik değişimlerin sırasında varyasyonlar görülebilir ancak bu değişimlerin net etkisi sonucu malign fenotip görülmektedir(9).

Larinks kanseri de çeşitli genetik mutasyonların zaman içinde birikerek çok katlı yassı epitelde hücresel ve morfolojik anormalliklerle neden olduğu multistep karsinogenez ile ilişkilidir (10). Çeşitli etyolojik ve genetik faktörler önce laringeal malign prekürsör lezyonlara daha sonra da bu lezyonlardan invaziv karsinoma progresyona neden olmaktadır. Califano ve ark. baş boyun kanserlerinde genetik değişimlerin inceledikleri bir model oluşturmuşlardır(11).Buna göre kromozomal kayıp veya kazançların allelik dengesizliğe yol açtığı ve malign prekürsör lezyonların evresi ile korelasyon gösterdiği ileri sürülmektedir(11). Larinks kanserinde en sık mutasyona uğrayan gen p53'tür ancak larinks kanserindeki prognostik rolü kesin değildir(12-14). EGFR overekspresyonu agresiflik, nodal metastaz ve düşük

sağkalımla ilişkili bulunmuştur(14, 15). Siklin D1/D3,COX2 ve galectin 3 gibi bazı markerların invazyon ve sağkalımla ilişkili olabileceği öne sürülmektedir(14, 16). Larinks kanseri'nde klinikte kullanılan TNM evrelemesi ve hastalık klinik evresi Tablo2.1 ve 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.1- American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8. Edisyon larinks kanseri TNM evrelemesi (Amin MB ve ark (17) 'dan uyarlanmıştır.)

T EVRESİ	
	PRİMER TÜMÖR (T)
( ) Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
( ) Tis	Karsinoma *in situ**
SUPRAGLOTTİS	
( ) T1	Tümör supraglottisin tek bir alt bölgesine lokalize, normal vokal kord hareketleri
( ) T2	Tümör supraglottisin, glottisin veya supraglottis dışındaki bir bölgenin birden fazla alt bölgesine localize (örn., dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinus medial duvarı), normal vokal kord hareketleri
( ) T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte ve/veya şu bölgelerden herhangi birini invaze ediyorsa: postkrikoid bölge, pre-epiglottik saha, paraglottik bölge, ve/veya tiroid kıkırdak iç perikondrumu
( ) T4	Orta-ileri veya çok ileri evre hastalık
( ) T4a	Orta-ileri evre lokal hastalık. Tümör tiroid kıkırdak dış perikondriumunu invaze ediyor ve/veya larinks dışındaki yapılara invaze oluyor ise (örn. Trakea,dilin ekstirnsik kasları, strap kaslar, tiroid ve özofagus da dahil olmak üzere boyunun yumuşak dokuları)
( ) T4b	Çok ileri evre lokal hastalık. Tümör prevertebral boşluğu invaze ediyor,karotid arteri çevreliyor veya mediastinal yapıları invaze ediyorsa
GLOTTİS	
( ) T1	Tümör vokal kord veya kordlara sınırlı (anterior veya posterior komissürü tutabilir),normal vokal kord hareketleri
( ) T1a	Tümör tek vokal korda sınırlı
( ) T1b	Tümör her iki vokal kordu da invaze ediyor
( ) T2	Tümör supraglottis ve/veya sublottise uzanıyor, ve/veya bozulmuş vokal kord hareketleri ile birlikte

( ) T3	Tümör larinkse sınırlı vokal kord fiksasyonu ile birlikte ve/veya paraglottik boşluk invazyonu ve/veya tiroid kıkırdak iç perikondriumu invazyonu
( ) T4	Orta-ileri veya çok ileri evre hastalık
( ) T4a	Orta-ileri evre lokal hastalık. Tümör tiroid kıkırdak dış perikondriumunu invaze ediyor ve/veya larinks dışındaki yapılara invaze oluyor ise (örn. Trakea,dilin ekstirnsik kasları, strap kaslar, tiroid ve özofagus da dahil olmak üzere boyunun yumuşak dokuları)
( ) T4b	Çok ileri evre lokal hastalık. Tümör prevertebral boşluğu invaze ediyor, karotid arteri çevreliyor veya mediastinal yapıları invaze ediyorsa
	SUBGLOTTİS
( ) T1	Tümör subglottise sınırlı ise
( ) T2	Tümör subglottise uzanıyor ise, normal veya bozulmuş vokal kord hareketleri ile birlikte
( ) T3	Tümör larinkse sınırlı vokal kord fiksasyonu ile birlikte ve/veya paraglottik boşluk invazyonu ve/veya tiroid kıkırdak iç perikondriumu invazyonu
( ) T4	Orta-ileri veya çok ileri evre hastalık
( ) T4a	Orta-ileri evre lokal hastalık. Tümör krikoid veya tiroid kıkırdağı invaze ediyor ve/veya larinks dışındaki yapılara invaze oluyor ise (örn. Trakea, dilin ekstirnsik kasları, strap kaslar, tiroid ve özofagus da dahil olmak üzere boyunun yumuşak dokuları)
( ) T4b	Çok ileri evre lokal hastalık. Tümör prevertebral boşluğu invaze ediyor,karotid arteri çevreliyor veya mediastinal yapıları invaze ediyorsa

N EVRESİ	**BÖLGESEL LENF NODLARI (N)** ENI – EKSTRANODAL İNVAZYON
( ) Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
( ) N0	Bölgesel lenf nodu invazyonu yok
( ) N1	Tek ipsilateral lenf noduna metastaz, en büyük çapı ≤ 3 cm boyutunda ENI (-)
( ) N2	Tek ipsilateral lenf noduna metastaz, en büyük çapı >3 cm ile ≤ 6 cm arasında ve ENI (-); **VEYA** multipl ipsilateral lenf nodlarına metastaz, en büyük çapı ≤ 6 cm boyutunda ve ENI (-); **VEYA** bilateral veya kontrlateral lenf nodlarına metastaz, en büyük çapı ≤ 6 cm

	boyutunda ve ENI (-);
( ) N2a	Tek bir ipsilateral lenf noduna metastaz, en büyük çapı >3 cm ile ≤6 cm arasında ve ENI (-)
( ) N2b	Multipl ipsilateral lenf nodlarına metastaz, en büyük çapı ≤ 6 cm boyutunda ve ENI (-)
( ) N2c	Bilateral veya kontrlateral lenf nodlarına metastaz, en büyük çapı ≤ 6 cm boyutunda ve ENI (-)
( ) N3	En büyük çapı > 6 cm boyutunda lenf nodu metastazı, ENI (-); **VEYA** klinik olarak belirgin ENI (+) olan herhangi bir lenf nodu metastazı
( ) N3a	En büyük çapı > 6 cm boyutunda lenf nodu metastazı, ENI (-);
( ) N3b	Klinik olarak belirgin ENI (+) olan herhangi bir lenf nodu metastazı

M EVRESİ	**UZAK METASTAZ (M)**
( ) M0	Uzak metastaz yok
( ) M1	Uzak metastaz mevcut

Tablo 2.2- American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8. Edisyon larinks kanseri hastalık evrelemesi (Amin MB ve ark (17) 'dan uyarlanmıştır.)

HASTALIK EVRESİ	**T**	**N**	**M**
( ) 0	Tis	N0	M0
( ) I	T1	N0	M0
( ) II	T2	N0	M0
( ) III	T3 T1, T2, T3	N0 N1	M0 M0
( ) IVA	T4a T1, T2, T3, T4a	N0, N1 N2	M0 M0
( ) IVB	T4b Herhangi T	Herhangi N N3	M0 M0
( ) IVC	Herhangi T	Herhangi N	M1

2.2 Anjiyogenez

Tümör gelişiminin yeni kan damarlarının oluşmasına bağımlı olduğu hipotezi ilk defa Folkman tarafından 1971 yılında yaptığı çalışma sonrası ortaya atılmıştır (18). Folkman'a göre tümör dokusunun yeni damarlanma olmadan 1-2 mm^3 'ün üzerinde büyümesi mümkün değildir. Aynı zamanda tümör tarafından salgılanan difüze olabilen anjiyogenik faktörlerin olması gerektiği ve bu faktörlerin bloke edilmesinin kanser tedavisinde rolü olabileceğini öne sürmüştür (18).Anjiyogenik faktörlerin keşfi önce 1985 yılında bFGF'nin saflaştırılıp sekanslanması ve daha sonra 1989 yılında hipofiz hücrelerinden izole edilen VEGF'nin keşfi ile başladı ve günümüze kadar da halen devam etmektedir (19, 20) . Anjiyogenez inhibitörlerinin keşfi ise yine 80'li yıllardan günümüze kadar devam etmektedir.

'Anjiyogenik dönüşüm *(switch)*' ortamdaki proanjiyogenik faktörlerin anti anjiyogenik faktörleri geçerek net dengeyi değiştirmesi sonucu ortaya çıkar. Bu sayede tümör anjiyogenik fenotip kazanarak yeni damarlar oluşturur ve hızlı bir büyüme fazına girerler (21). Bu faktörlerin salınımını çeşitli genler kontrol eder. Rak ve ark. proanjiyogenik faktörlerin ifadelenmesinin artışının ve antianjiyogenik faktörlerin ifadelenmesinin azalmasının onkogen aktivasyonu sonucu gerçekleştiğini öne sürmektedir (22). Önemli bir tümör süpresör gen olan p53'ün tümörigenez üzerine etkisini sadece proliferasyonu engelleyerek değil aynı zamanda anjiyogenezi inhibe eden trombospondin-1'in ifadelenmesini artırarak yaptığı gösterilmiştir (23).

Hızlı çoğalan tümör hücreleri yüksek metabolik aktivite gösterirler. Daha fazla oksijen ve besin kullanırlar. Bu nedenle hem toksik metabolitlerini atmak hem de ihtiyaç duyduğu molekülleri almak için yoğun kanlanmaya ihtiyaç duyarlar. Ancak yeni oluşan tümör damarları dezorganize ve inefektif olduğu için ihtiyacı tam olarak karşılayamaz ve tümörün merkezinde daha hipoksik ve asidik tümör alanları oluşur. Bu hipoksik ortam HIF adı verilen selüler nükleer bir faktörün ifadelenmesini artırır ve bu sayede hipoksiye yanıt oluşur. HIF'in tümör neoanjiyogenezinde VEGF bağımlı olarak önemli rol oynadığı gösterilmiştir (24). IGF ve IGFBP'ler, matrix

metalloproteinazlar gibi proteinler HIF tarafından indüklenirler ve hücre proliferasyonu, sağkalımı ve metastatik potansiyelini artırırlar (25, 26).

Anjiyogenez var olan damarlardan dallanarak yeni damar oluşumuna verilen isimdir. Vaskülogenez ise primitif damar oluşumudur ve mezodermden endotelial prekürsör hücrelerin farklılaşması ile oluşur. Embriyonik damar oluşumunda VEGF ve VEGFR2 en önemli rol oynayan aracılardır (27). Embiyonik hayatta gelişen damar yapıları ve endotelial hücreler erişkin yaşa geldiğinde fizyolojik veya patolojik koşullarla tekrar aktive olabilir. Damar oluşumunda hemodinamik faktörlerin yanı sıra endotelial hücrelerin büyüyen uçlarında bulunan uç hücreleri*(tip cell)* de önemli rol oynar. Bu hücreler aynı bir aksonal büyüme konisi gibi kemoatraktan moleküllere yanıt vererek uzayan endoteliyal filizlenmelere rehberlik ederler (28, 29).

Endotelial uç hücreleri sayısız ince filopodiaları ile çevresindeki yapıları fark eder ve buna uygun olarak kapiller filizlenmeyi yönlendirir. Uç hücreleri VEGF'nin yüksek afiniteli bir reseptörü olan VEGFR-2 eksprese ederler (24, 28). VEGF bu sayede endotelial hücrelerin bölünmesini, migrasyonunu sağlar ve hedefine ulaşmasında kritik bir rol oynar (30). Fizyolojik anjiyogenezde hiyerarşik damar yapısı korunmuştur ve mural hücreler (düz kas, perisit) tamdır ve aralarında boşluklar izlenmez. Buna karşın tümör ilişkili anjiyogenezde anormal, hiyerarşik yapısı bozulmuş, düzensiz yapılı tortiözdamarlar izlenir. Tümör ilişkili anjiyogenezdeki mural hücrelerin düzensizliği ve interselüler boşluklar nedeniyle vasküler geçirgenlik artmıştır. Bu nedenle tümör nedeniyle doku ödemi oluşmaktadır. Ayrıca bu boşluklar metastatik potansiyeli artırmaktadır.

Patolojik ve fizyolojik koşullarda anjiyogenezin çeşitli mekanizmaları vardır. Endotelyal filizlenme var olan damardan yeni damar oluşumunu tanımlarken vaskülogenez endotelyal hücreye farklılaşan progenitör hücrelerle oluşan yeni damarları tarif eder. İntussepsiyon ise var olan damar lümeni ikiye bölünüp iki ayrı damar oluştururken vasküler kooptasyonda tümör hücreleri var olan damarlar boyunca yayılırlar. Vasküler taklit*(mimicry)'*de ise damar duvarının bir kısmını tümör hücreleri kendisi oluşturur.

Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin salınımı sadece tümör hücresinden olmamakta aynı zamanda hem tümör mikroçevresindeki endotelyal hücreler, perisitler, düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi stromal hücrelerden, hem de tümörü infiltre eden immün hücrelerden olmaktadır(31, 32).

2.3 Angiogenin (ribonükleaz 5)

Angiogenin (ANG) 14-kDa ağırlığında 123-aminoasitten oluşan bir ribonükleaz süper ailesi üyesi proteindir ve ilk defa 1985 yılında HT-29 kolon adenokarsinom hücre kültüründe izole edilmiştir(33).Hipoksik koşullarda ifadelenmesi artan birçok anjiyogenik genden biri ile ifade edilir ve ANG'yi kodlayan gen her haploid genomda tek kopya olacak şekilde 14q11 kromozomunda kodlanmıştır (34, 35). Endotelial hücrelere afinitesi vardır; hücre yüzeyine tutunur, 170 kDa reseptörüne veya 42 kDa bağlayıcı proteinine bağlanır ve bu sayede etki gösterir (36-39). ANG'nin aktivite gösterebilmesi için nükleusta akümüle olması gerekir ve nükleer taşınımı inhibe edilirse anjiyogenik aktivitesinin yok olduğu gösterilmiştir (37, 40). Hem kanser hücrelerinde hem de vasküler endotelde ribozomal RNA transkripsiyonunu stimüle ederek kanser hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi artırdığı gösterilmiştir (41-44).

ANG'nin tümör büyümesi ve metastazıyla olan ilişkisi önceleri sadece onun anjiyogenik aktiviteyi stimüle etmesine bağlanmıştır (45, 46). Ancak daha sonra ANG'nin kanser hücrelerine direkt etki ederek rRNA transkripsiyonunu artırdığı, ribozom biyogenezini ve tümörigenezini stimüle ettiği gösterilmiştir (34, 46). ANG'nin diğer anjiyogenik faktörlerden farklı olarakrRNA transkripsiyonunu direk artırdığı gösterilmiştir ve diğer anjiyogenik faktörlerin etki edebilmesi için bu mekanizma gereklidir(37, 45). Bu anlamda ANG'nin varlığı ve özgün etkisi diğer faktörlerin anjiyogenik etki gösterebilmesi için bir ön koşuldur (37). Aynı zamanda p53 tümör supresör genini hedefleyerek anti-apoptotik etki de göstermektedir (44, 47). ANG'nin serviks, meme, akciğer, karaciğer, over, prostat, kolon,lenfoma,

lösemi, melanom ve baş-boyun gibi birçok kanserde artmış düzeyde bulunduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur (44, 48).

2.4 Endoglin (CD105)

Endoglin homodimerik, hipoksi ile indüklenebilen, 180 kDa ağırlığında bir hücre membranı glikoproteinidir (49). Disülfid bağları ile birbirine bağlı iki alt üniteden oluşur. Kodlayan gen 9q34 kromozomu üzerinde bulunur ve 14 ekzona ayrılmıştır (49). Çoğunlukla vasküler endotelde bulunmasına rağmen, hematopoietik hücrelerin yüzeyi ve fibroblastlarda da bulunabilir (50). Dönüştürücü büyüme faktörü *(Transforming growth factor)* (TGF) -β1 reseptör kompleksinin üyesidir ve sinyal yolağının regülasyonunda görev alır. TGF-β pleiotropik bir sitokin olup hücre proliferasyonu, migrasyon ve differansiasyonunu regüle ederek anjiyogenez üzerinde düzenleyici rol oynar (51). CD105, TGF-β I ve II ile kompleksler oluşturur ve transkripsiyonel düzeyde etkili olan Smad proteinlerinin fosforilasyonunu düzenler(52, 53). Ortamda TGF-β yokluğunda ise, hipoksik stres altında anti-apoptotik özellik gösterir ve bu nedenle pro-apoptotik faktörlerin etkisine karşı koruyucu bir etkisinin de olabileceği önerilmektedir (54, 55).

İntratümöral küçük damar yoğunluğu *(microvessel density*, MVD), daha önce oluşmuş olan damar ile prolifere olan endoteli ayıramayan CD31, CD34 ve Faktör VIII gibi panendotelial belirteçler ile çalışılmaktadır(56).CD105'in diğer panendotelyal belirteçlerden (CD31, CD34, Faktör VIII) farkı, yeni oluşan damarlara daha özgü olup normal dokuların kan damarlarında eksprese olmamasıdır (57).Hipoksi CD105 geninin promoterini aktive eder, mRNA transkripsiyonunu ve protein translasyonunu artırır (58). Aktif olarak prolifere olan kan damarlarında görülür, tümörlerde daha spesifik olarak ifadelenir ve bu durum CD105'i önemli bir biyobelirteç adayı molekül olarak ortaya çıkarır.Daha önceki çalışmalarda birçok malignitede prognozla ilişkili olduğu gösterilse de anjiyogenezdeki rolü kesin olarak gösterilememiştir (59).

2.5 Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)/Çözünebilen vasküler endotelyal büyüme faktörü *reseptörü-1 (*sVEGFR1) / Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2(VEGFR2)

Tümör ilişkili anjiyogenez, temelde tümör ve tümör mikroçevresinden salınan çeşitli anjiyogenik faktörlerin endotel hücrelerine etki ederek tümör gelişimi için yeni damarlar oluşturmasına denir. Bu yolağın başlıca ve en belirgin uyaranıvasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dir. VEGF ligand ailesi 6 üyeye sahiptir: VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasental büyüme faktörü (PIGF). VEGF geninin alternatif uçbirleştirme*(alternative splicing*)'i ile 5 farklı VEGF izoformu oluşur (60). Bu izoformların heparine olan bağlanma affiniteleri farklıdır ve bu durumun ekstrasellüler matriks'e difüzyon oranlarında fark yarattığı düşünülmektedir (60). VEGF'nin major regülatör mekanizmaları hipoksi, tümör süpresör ve onkogen fonksiyonları, sitokinler ve büyüme faktörleridir (60). VEGF hem tümör veya mikroçevresinden parakrin etki ile hem de endotel hücresinden otokrin etki ile işlev gösterir. Kanser ilişkili patolojik anjiyogenezde major olarak parakrin etki sorumlu iken, otokrin etki ile fizyolojik koşullarda endotel hücresi kendi sağkalımını sağlar (61).

VEGF ailesinin 3 adet farklı tirozin kinaz reseptörü mevcuttur. VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3. Bu reseptörler primer olarak endotel hücrelerinde eksprese edilirler (62). VEGFR-1 yüksek afiniteli reseptör iken VEGFR-2 düşük afiniteli reseptördür (60). PIGF ve VEGF-B, VEGFR-1'e bağlanırken, VEGF-A hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2'ye, VEGF-C ve VEGF-D ise VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanır (60). VEGF-C ve VEGF-D daha çok lenfanjiyogenez ile ilişkilidir. Ligandın bağlanması ile reseptör dimerize olur ve intraselüler tirozin rezidüleri otofosforile olmaya başlar.

VEGF'nin anjiyogenik etkisi major olarak VEGFR-2 üzerinden olmaktadır. Patolojik ve fizyolojik anjiyogenez durumlarında VEGFR-2 üzerinden, doz bağımlı olarak etki gösterir ve endotel hücre farklılaşması, sağkalım ve vasküler geçirgenliği artırır (63). Diğer taraftan, proanjiyogenik faktörler VEGFR-1 üzerinden çok az etki gösterir ve bu reseptörün kesin rolü tam anlaşılamamıştır (64). Ancak VEGFR-1'in bir

“tuzak *(decoy)* reseptör” gibi işlev gördüğü ve fazla VEGF’i sekestre ederek anjiyogenezin negatif regülatörü olabileceği öne sürülmüştür (60). VEGFR-1’in sVEGFR-1 adındasuda çözünebilen (s*oluble*) izoformu da bulunmaktadır. Bu form da VEGF ligandı için bağlayıcı görev görmektedir ve endotelyal dallanmayı inhibe eder.

2.6 Osteopontin

Osteopontin (OPN), bir sekretuar fosfoglikoprotein olup, küçük integrin—bağlayan ligand N-linked glikoprotein(SIBLING)ailesine mensuptur (65). İlk defa Senger tarafından 1979’da tanımlanmıştır (66). Aspartat ve siyalik asit rezidülerinden zengin olup birkaç fonksiyonel bölgesi mevcuttur (67).Hücre yüzeyindeki integrinler ve CD44’e bağlanarak etki gösterir(68). CD44 bir hücre yüzey glikoproteini olup hücre-hücre ve hücre-matrix etkileşimi, migrasyon ve tümor progresyonunda görev alır (69). Kök hücre markeri olarak kabul edilir (70). CD44’e ek olarak bazı dokular daha yüksek miktarda CD44 izoformlarını ekprese eder ve CD44v şeklinde kodlanan varyantlar içerir (69). Osteopontinin bağlanması için CD44v6 gereklidir (71). Osteopontinin anjiyogenezi indüklediği bir yolak da PI3K/AKT ve ERK1/2 yolağı olarak gösterilmiştir (72).

İntegrinler α ve β subunitlerinden oluşan heterodimerik glikoproteinlerdir(73). 17 adet α ve 8 adet β subuniti tanımlanmış olup en az 22 farklı kombinasyon oluşturabilmektedir (74). OPN için primer integrin reseptörleri αvβ1, αvβ5 ve özellikle de αvβ3’tür(75, 76). OPN bağlandığı reseptörler aracılığı ile hücre adezyonu, migrasyon, sinyal iletimi, doku yeniden modellenmesi ve anjiyogenezde önemli rol oynar (77). İntegrin αvβ3’ün tümör neovaskülarizasyonunda önemli rol oynadığı ve bu sayede proliferasyona ve metastaza yol açtığı gösterilmiştir (78). Deneysel çalışmalarda makrofaj fonksiyonlarını inhibe ettiği ve metastazların progresyonunu arttırdığı öne sürülmektedir(79). Bu nedenle OPN fonksiyonlarının inhibe edilmesi yoluyla tedavi amaçlı bazı yöntemler geliştirilmiştir (80, 81).

OPN aktif sekrete edilen bir proteindir; kan ve vücut sıvılarında saptanabilir(82). Artmış OPN ekspresyonunun, baş boyun skuamözhücreli

karsinomlarında, meme ve kolorektal karsinomlarda ileri evre ve kötü prognozla ilişki olduğuna dair yayınlar mevcuttur (83). OPN aynı zamanda bazı normal dokularda, inflamasyon, iskemik kalp hastalıkları, böbrek hastalıkları ve kemik yeniden modellenmsisırasında da sekrete edilmektedir (84-88). Bu nedenle OPN ile tumor progresyonu ilişkisini inceleyen çalışmaların dokudaki ekspresyon spesifitesinin de araştırılması önerilmektedir (89).

2.7 İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein(IGFBP-3)

Anjiyogenezle ilişkili major anjiyogenik faktör VEGF'dir. VEGF ekspresyonu, İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF) 1ve 2 tarafından regüle edilen bir transkripsiyon faktörü olanHIF-1tarafından regüle edilir(90, 91). Bu yolak tümörün hipoksik ortamda sağkalımı ve metabolizması için önemlidir. Bu nedenle IGF'nin HIF-1 ve VEGF aracılığı ile tümör anjiyogenezini artırdığı ileri sürülmektedir (92, 93). Büyüme faktörleri içinde IGF, hücre proliferasyonunun artması ve apoptozun baskılanmasında çok önemli bir role sahiptir (94).

İnsulin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP-3) ise, 6 adet üyesi bulunan IGFBP ailesine mensup bir molekül olup IGF'nin serumdaki major bağlayıcı proteinidir (92, 95). Dolaşan IGFBP-3 miktarının yetişkinlerde yaklaşık 2-7 µg/mL olduğu gösterilmiştir (96). IGFBP-3,IGF-1'e bağlanır ve onun reseptörü olan IGF-1R'ye bağlanmasını inhibe eder. Bu sayede IGF bağımlı olarak anti-tümör özelliği gösterdiği bilinmektedir(95, 97). Aynı zamanda IGF bağımsız şekilde çeşitli tümör modellerinde anti proliferatif etki gösterdiği de bulunmuştur (95, 97, 98).

IGFBP-3'ün integrin aracılı hücre adezyonunu da hem IGF bağımlı hem de IGF bağımsız şekilde inhibe ettiği ve bu sayede tümör invazyonunu ve metastazını da engelleyebileceği gösterilmiştir(99). Tüm bu anti tümöral özelliklere zıt olarak bazı çalışmalarda ise normal gelişim ve tümör anjiyogenezinde proanjiyogenik rol oynayabileceği öne sürülmüştür(100, 101). Bu nedenle IGFBP-3'ün anjiyogenez ve tümör gelişimi/prognozu üzerine etkisinin araştırılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tezin amacı larinks skuamöz hücreli karsinomunun tanı, tedavi ve takibinde kullanılabilecek moleküllerin tespit edilmesi ve klinik parametrelerle korelasyonunun araştırılmasıdır. Bu sayede ileride yapılacak olan çalışmalara destek olunması ve literatüre katkısağlanmasıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hasta ve Gönüllü Bireylerden Kan Örnekleri Toplanması

Bu çalışmada Mayıs 2018 - Şubat 2020 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda Larinks SCC yeni tanısı alıp tedavi edilen 60 hasta ve 20 sağlıklı gönüllü birey incelenmiştir. Hasta ve kontrol grubundan toplanan kan örneklerinde kan alımından hemen sonra serum izolasyonu yapılmış ve izole edilen kanlar, -80 ^{o}C'de saklanmıştır. Hedeflenen hasta sayısına ulaşılınca tüm katılımcıların kandaki çeşitli biyobelirteç adayı moleküllerin seviyesi ELISA yöntemi ile tespit edilmiş ve hasta ve tümör özellikleri, hastalık evresi, nüks ve sağkalım parametreleri açısından anlamlı fark olup olmadığı araştırılmıştır. Örnekler hastalardan tanı anında ve herhangi bir tedavi (KT,RT) / operasyon geçirmeden toplanmıştır. Hastaların tanı anından verilerin analiz edileceği ana kadar Hacettepe Üniversitesi KBB Anabilim Dalı'ndaki klinik takiplerine devam edilmiş ve prospektif veriler elde edilmiştir. Gönüllü grubu; KBB polikliniğine başvuran hasta yakınları içerisinden herhangi bir ek hastalığı olmayan ve yaşları hasta grubuna benzer olanlardan seçilmiştir. Yeni tanı larinks SCC olup daha önce cerrahi geçiren, KT/RT alan veya komorbid hastalığı olanlar bireyler çalışma dışında tutulmuştur.

3.2 Kan Örneklerinin ELISA Yöntemi ile Analiz Edilmesi

ELISA *(Enzyme-linked immunosorbent assay)* Yöntemi: Bu yöntem, hedef antijen (veya antikor)un spesifik antikor (veya antijen) kullanılarak yakalanması ve hedef molekülün substrat-enzim reaksiyonu ile tespit edilmesi/kantitasyonuna dayanır. Antijen tespit etmek üzere antikor emdirilmiş mikrokuyular içeren plaklar kullanılır. Öncelikle plağın ilk iki sütunundaki kuyulara uygun şekilde dilüe edilmiş standard ve boş çözeltiler konur. Daha sonra örneklerin geleceği diğer kuyulara örnekler ile birlikte uygun analiz çözeltileri eklenir. Daha sonra ise hazırlanan Biotin-konjugat'ı tüm kuyulara eklenerek oda sıcaklığında mikroplak çalkalayıcıda inkübe edilir. İnkübasyon sonrası yıkama yapılarak bağlanmamış biyolojik kompotentler elimine edilir. Takiben Streptavidin-HRP solüsyonu kuyulara eklenir. Streptavidin

biotin ile kuvvetli bağ kurarak kompleks oluşturur. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra HRP ile reaksiyona girerek renk oluşturan bir substrat kuyulara eklenir. Yine bir süre inkübasyondan sonra reaksiyon durdurucu asidik solüsyon eklenerek reaksiyon durdurulur ve 450 nm'de spektrofotometre cihazında absorbans ölçülerek okuma yapılır. Çıktılarda OD*(optical density)* değerini baz alarak ortalama derişim hesaplanacak şekilde veriler sunulur.

Araştırmada incelenmek üzere VEGF (Thermo Fisher, katalog no: KHG0111), sVEGFR1 (Thermo Fisher, katalog no: BMS268-3), VEGFR2(Thermo Fisher, katalog no: BMS2019), CD105 (Thermo Fisher, katalog no: EHENG) ve Angiogenin (Thermo Fisher, katalog no: EHANG), IGFBP-3 (Thermo Fisher, katalog no: EHIGFBP3) ve Osteopontin (Thermo Fisher, katalog no: BMS2066) molekülleri seçilmiştir. Alınan serum örneklerinde ELISA yöntemiyle bu moleküllerin düzeyleri tespit edilmiştir. Bu yöntemde çalışmaya dahil edilen hastaların serumlarındaki hedeflenen protein düzeyleri, yukarıda belirtilen moleküllerin insan ELISA kitleri ile belirlenmiştir. Deney, ELISA kiti üretici firma protokolüne göre uygulanmıştır. Özet olarak, VEGF, sVEGFR1, VEGFR2, CD105, Angiogenin, IGFBP3, Osteopontin antikorları ile kaplı 96 kuyulu plaklara hasta serumları ve protein standartları dublike olarak eklendikten sonra sırasıyla, sekonder antikor deteksiyon antikoru, HRP, substrat solüsyonu ve son olarak reaksiyon blokörü eklenmiştir. Her aşama arasını takiben protokolde ifade edilen zaman aralıklarında solüsyon inkübasyonları ve inkübasyon sonrası yıkama basamakları gerçekleştirilmiştir. Son basamaktan sonra absorbsiyon miktarı kuyu okuyuculu spektrofotometre (Spectramax, CA, ABD) cihazı ile tespit edilmiştir. Protokolde belirtilen dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Elde edilen OD değerleri ile analiz gerçekleştirilmiştir. Takiben tanı anında ve takipte hastalığın T evresi, N evresi, M evresi, demografik parametrelerve hastalık prognozu (sağkalım, nüks varlığı ve nüks var ise geçen süre) gibi parametreler toplanmıştır.

3.3 İstatistiksel Analizler

Çalışmaya katılan hasta grubunun kan biyobelirteç seviyeleri ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, normal dağılım gösteren parametrik veriler için Student's t testi ve tek yönlü ANOVA testi, normal dağılmayan parametrik ve ordinal veriler için de Mann-Whitney U ve Kruskal-Wallis testleri yapılmıştır. Ayrıca, SCC tanısı alan hastalarda kan biyobelirteç seviyeleri ile klinikopatolojik özelliklerin ilişkisi Fisher testi, Pearson/Spearman - korelasyon analizleri aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Hastaların kan biyobelirteç düzeyleri ve klinikopatolojik ile demografik özelliklerinin sağkalım üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla da Kaplan-Meier testi kullanılarak sağkalım analizi yapılmıştır. Log-rank testi ile farklı gruplar arasındaki sağkalım farkları istatistiksel anlamlılık açısından test edilmiştir. ROC analizi yapılarak biyobelirteç adayı moleküllerin muhtemel eşik değerleri saptanmış ve buna göre karşılaştırma yapılmıştır.

3.4 Veri Toplama Formu

HASTA NO:

YAŞ:

CİNSİYET:

T EVRESİ:

N EVRESİ:

M EVRESİ:

İLK ve SON VİZİT TARİHİ:

HASTALIK KLİNİK EVRESİ:

OSTEOPONTİN DUZEYİ:

IGFBP3 DÜZEYİ:

VEGF DÜZEYİ:

sVEGFR1 DÜZEYİ:

VEGFR2 DÜZEYİ:

ANGİOGENİN DÜZEYİ:

ENDOGLİN(CD105) DÜZEYİ:

4. BULGULAR

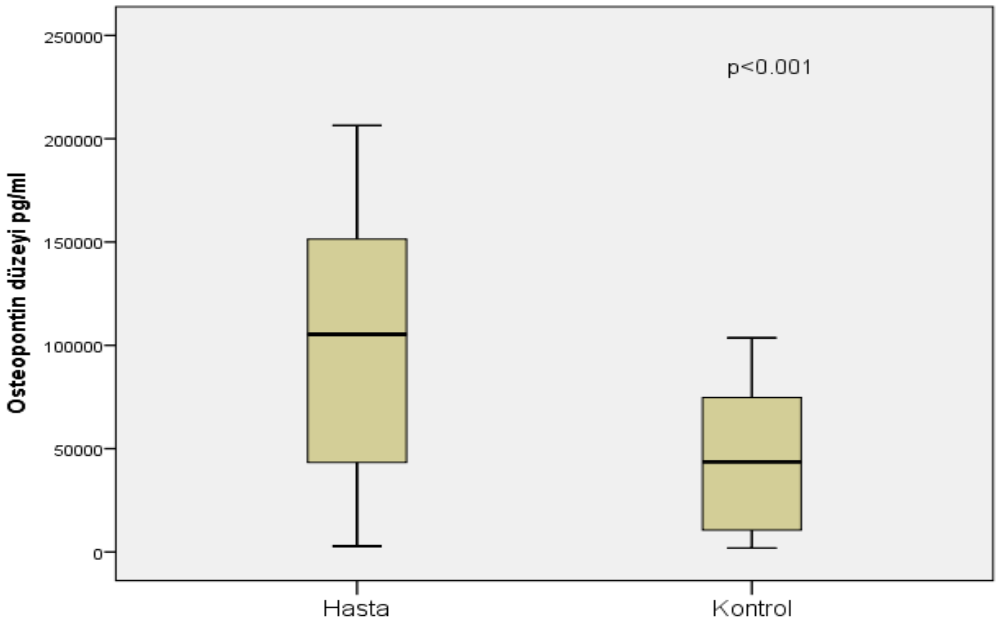
Çalışma grubu 60 hasta ve 20 kontrol olmak üzere toplam 80 kişiden oluşmaktadır. Çalışmaya dahil edilenlerin 76'sı erkek 4'ü (2 kişi hasta grubu; 2 kişi kontrol grubu)kadındır. Genel yaş ortalaması 62,86 ± 9,6'dır (62,55 ± 9,3 hasta grubu; 63,2 ± 10,6 kontrol grubu). Ortalama takip süresi 19,5 ± 9,7 aydır.Tüm hastalarda kanda Osteopontin, Endoglin, Angiogenin, IGFBP-3, VEGF, sVEGFR-1ve VEGFR-2 düzeyleri çalışılmıştır. 1 hastada VEGF düzeyi sıfıra yakın çıktığı için uç değer olarak kabul edilmiş ve VEGF ile ilgili çalışmalarda hesaplama dışı bırakılmıştır. Tüm çalışma grubunda: Osteopontin düzeyi median 84105 pg/ml (range, 1885 - 206390 pg/ml), Endoglin düzeyi median 4362,5 pg/ml (range, 1950 –9600 pg/ml), Angiogenin düzeyi median 105368 pg/ml (range, 47083 – 217344 pg/ml), IGFBP-3 düzeyi median 16675 pg/ml (range, 5375 – 62275 pg/ml), sVEGFR-1 düzeyi median 92 pg/ml (range, 46 – 498), VEGF düzeyi median 210 pg/ml (range, 90 – 896) ve VEGFR-2 düzeyi ortalama 10227,5 ± 2338,5 pg/ml olarak bulunmuştur. Hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bulunan farklar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1- Biyobelirteç adayı moleküllerin hasta grubu ve kontrol grubundaki düzeylerinin karşılaştırılması

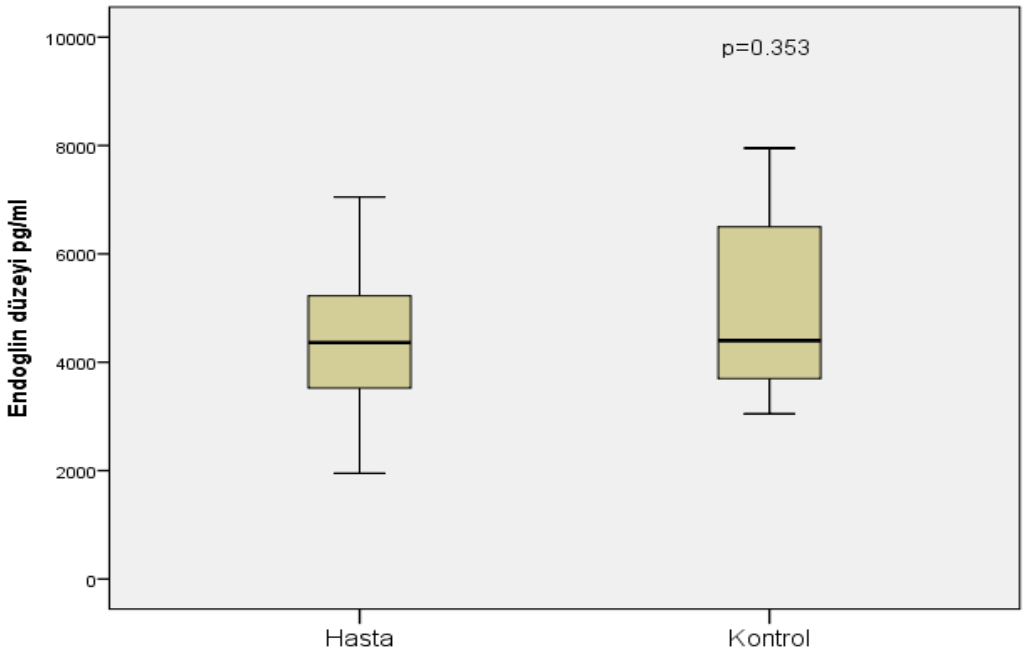
	Hasta grubu n=60	Kontrol grubu n=20	*p*
Osteopontin, pg/ml, median	105375	43545	**<0,001***
Endoglin, pg/ml, median	4362,5	4400	0,353
Angiogenin, pg/ml, median	106701	97938	0,491
IGFBP-3, pg/ml, median	19375	9550	**<0,001***
VEGF, pg/ml, median	240	165	**<0,001***
sVEGFR-1, pg/ml, median	94	73	**<0,01***
VEGFR-2, pg/ml, ortalama	10724	8737	**<0,01***

*İstatistiksel olarak anlamlı

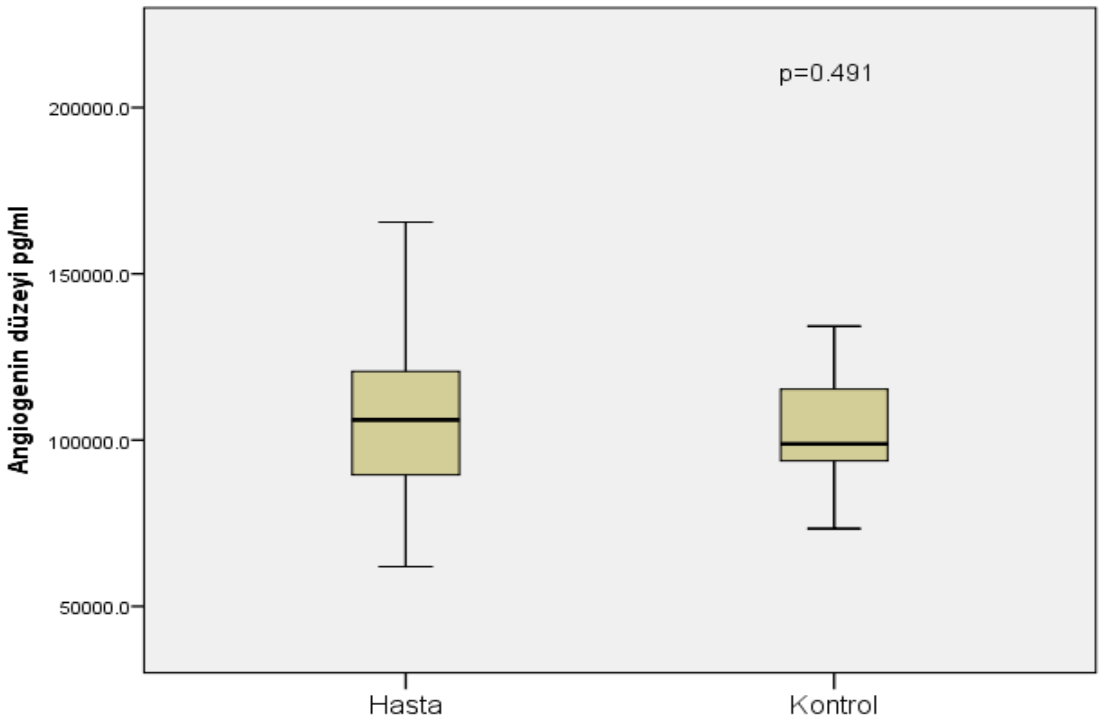
Hastalar ve kontrol grubu arasındaki farkların grafiksel olarak gösterimi Şekil4.1-4.7'da gösterilmiştir.



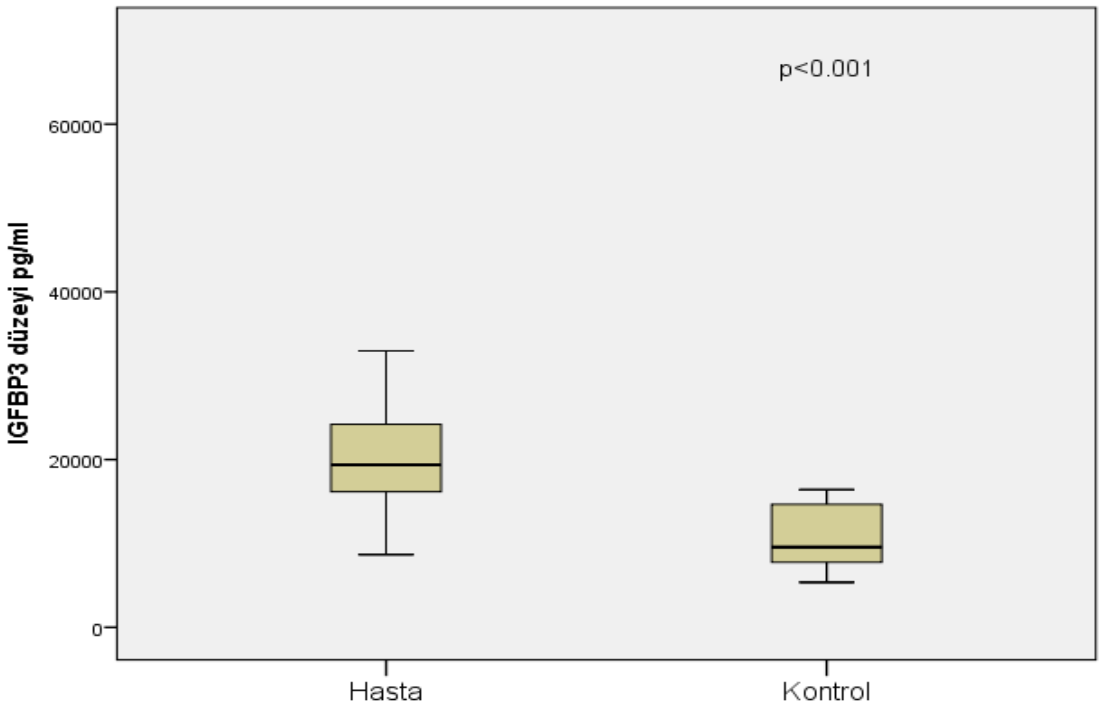
Şekil 4.1- Osteopontin düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



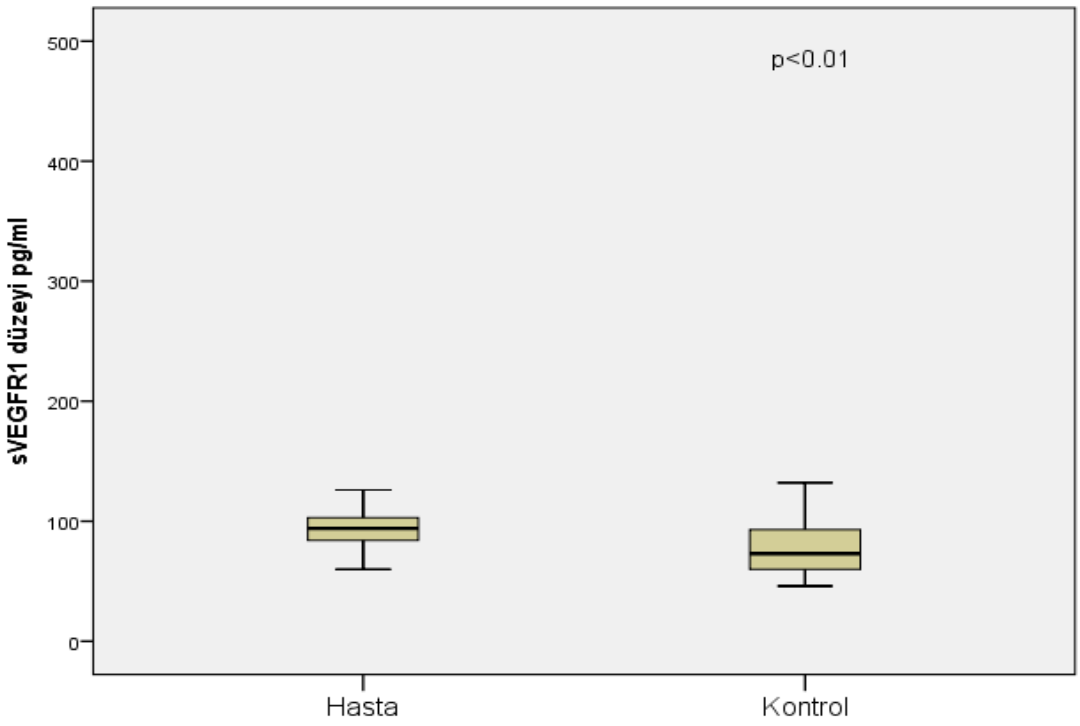
Şekil 4.2-Endoglin düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



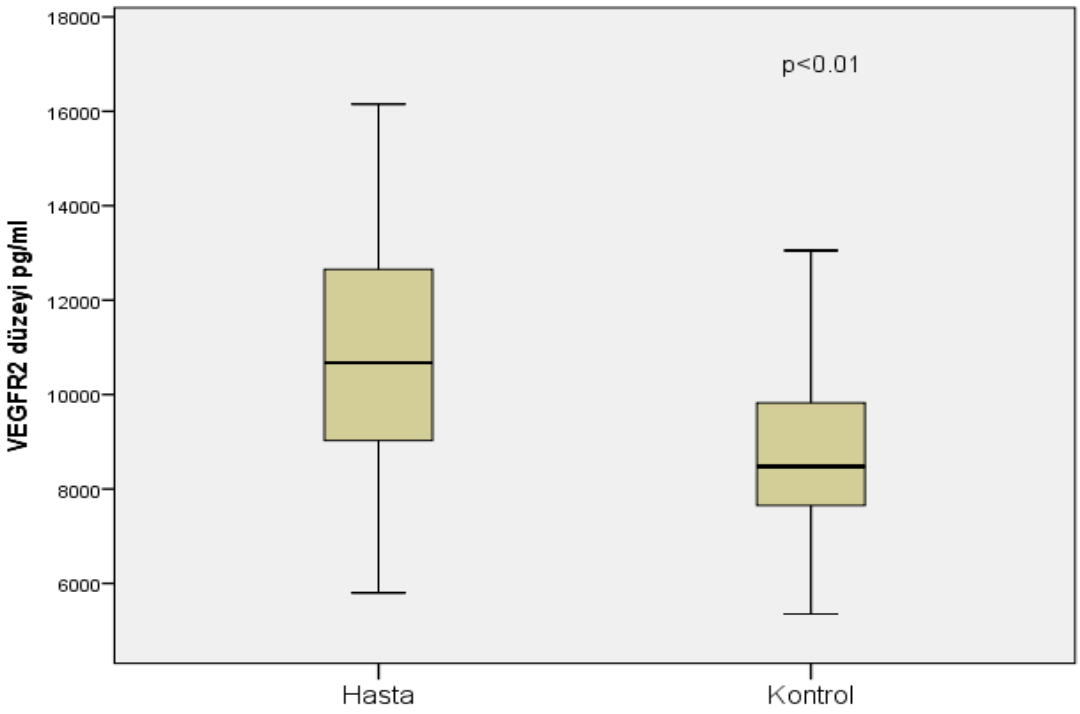
Şekil 4.3-Angiogenin düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



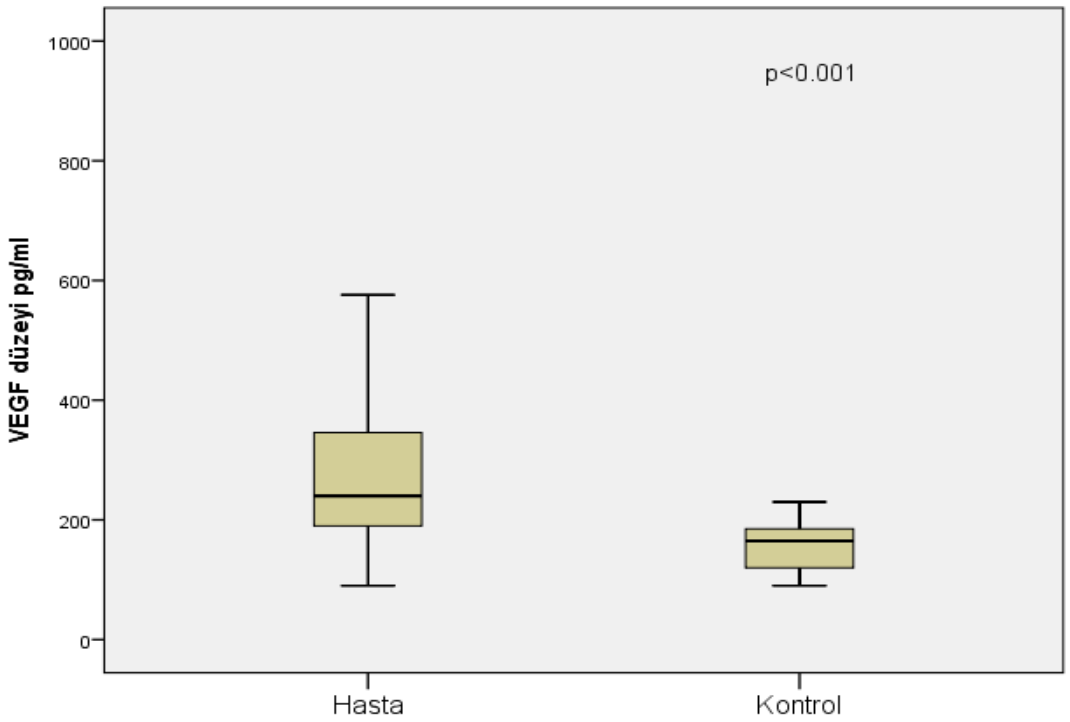
Şekil 4.4-IGFBP3 düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



Şekil 4.5-sVEGFR-1 düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



Şekil 4.6-VEGFR2 düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı



Şekil 4.7-VEGF düzeyinin hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımı

Hasta grubunu TNM evreleme sistemine göre incelendiğinde 13 hasta T1A (%21,6), 3 hasta T1B (%5), 9 hasta T2 (%15), 21 hasta T3 (%35), 13 hasta T4A (%21,6) ve 1 hasta T4B (%1,6) olarak bulunmuştur. N evresine bakıldığında ise ise 42 hasta N0 (%70), 5 hasta N1 (%8,3), 4 hasta N2A (%6,6), 3 hasta N2B (%5), 4 hasta N2C (%6,6) ve 2 hasta N3B (%3,3) ve toplam N^+ oranı %30 olarak bulunmuştur. 2 hasta (%3,3) tanı anında M1 olup uzak metastazı mevcutken 6 hastada (%10) takipte uzak metastaz gelişmiş ve toplam 8 hastada uzak metastaz gözlenmiştir.

Hastalığın klinik evrelemesine bakıldığında ise 16 hasta evre 1 (%26,6), 6 hasta evre 2 (%10), 15 hasta evre 3 (%25) ve 23 hasta evre 4 (%38, 19 hasta evre 4A, 2 hasta evre 4B ve 2 hasta evre 4C) olarak bulunmuştur. Hastalar erken evre (evre 1-2) ve ileri evre (evre 3-4) olarak gruplandırıldığında ise 22hasta (%36,6) erken evre, 38 hasta (%63,3) ileri evre olarak sınıflandırılmıştır.

Hastalarda T evresi ile çalışılan moleküller arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir (Kruskal-Wallis; Osteopontin p=0,499, Endoglin p=0,154, Angiogenin p=0,720, IGFBP-3 p=0,363, VEGF p=0,853, sVEGFR-1 p=0,372 ve ANOVA; VEGFR-2 p=0,130) ve T evresi artışıyla kandaki molekül düzeyi arasında bir artış trendi gösterilememiştir (Jonckheere-Terpstra; Osteopontin p=0,114, Endoglin p=0,82, Angiogenin p=0,344, IGFBP-3 p=0,149, VEGF p=0,532 sVEGFR-1 p=0,051 ve VEGFR-2 p=0,879).N^+ olan hastalarla N0 olan hastalar arasında çalışılan biyobelirteç adayı moleküllerin serum düzeyleri açısından anlamlı bir fark gösterilememiştir (Mann-Whitney U; Osteopontin p=0,961, Endoglin p=0,468, Angiogenin p=0,847, IGFBP-3 p=0,478, VEGF p=0,627, sVEGFR-1 p=0,853 ve Student T-Testi VEGFR-2 p=0,656).

Hastalar erken evre (T1-T2) ve ileri evre (T3-T4)olarak gruplandırıldığında iki grup arasında çalışılan moleküllerin düzey farkı istatistiksel olarak anlamlı değildir (Mann-Whitney U; Osteopontin p=0,747, Endoglin p=0,195, Angiogenin p=0,782, IGFBP-3 p=0,315, VEGF p=0,214, sVEGFR-1 p=0,177 ve Student T-Testi VEGFR-2 p=0,110).Hastalığın klinik evresi dikkate alındığında klinik evreler arasında anlamlı fark gösterilememiştir (Kruskal-Wallis; Osteopontin p=0,988, Endoglin p=0,488, Angiogenin p=0,997, IGFBP-3 p=0,893, VEGF p=0,860, sVEGFR-1 p=0,579 ve ANOVA; VEGFR2 p=0,255) ve evre artışıyla kandaki molekül düzeyi arasında bir artış trendi ilişkisi bulunamamıştır(Jonckheere-Terpstra; Osteopontin p=0,547, Endoglin p=0,195, Angiogenin p=0,696, IGFBP-3 p=0,596, VEGF p=0,363, sVEGFR-1 p=0,624 ve VEGFR-2 p=0,233).

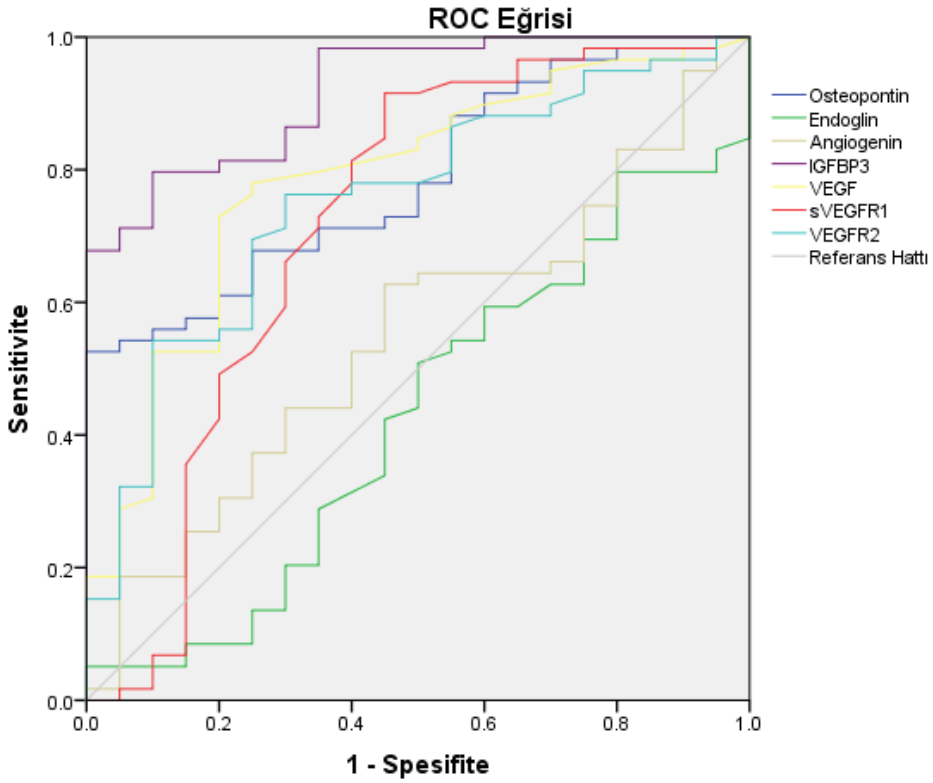
Korelasyon analizi yapıldığında sVEGFR-1 ile T evresi arasında orta düzeyde anlamlı korelasyon izlendi (Spearman r=0,260, p=0,04). N evresi ve hastalık evresi ile hiçbir biyobelirteç adayı molekül arasında anlamlı korelasyon izlenmedi. Yaş ile VEGFR-2 arasında orta düzeyde negatif korelasyon izlendi (Pearson r=-0,259, p=0,02).

Biyobelirteç adayı moleküller kendi arasında analiz edildiğinde ise VEGFR2'nin Osteopontin ile zayıf (Spearman r=0,240,p=0,032), IGFBP3 ile orta (Spearman r=0,331, p=0,003) ve VEGF ile orta (Spearman r=0,509,p <0,001) düzeyde

korelasyonu saptandı. Osteopontinin ise IGFBP3 ile kuvvetli (Spearman r=0,607, p<0,001), VEGF ile orta (Spearman r=0,32,p<0,01) ve sVEGFR-1 ile orta (Spearman r=0,361,p=0,001) düzeyde pozitif yöndekorelasyonu mevcuttu. IGFBP3'in ise VEGF ile orta (Spearman r=0,378, p=0,001) ve sVEGFR-1 ile orta (Spearman r=0,416,p<0,001) düzeyde pozitif yöndekorelasyonu bulunmuştur. Angiogenin ve Endoglin'in herhangi bir molekülle korelasyonu gösterilememiştir.

Metastatikhastalık görülen 8 hastanın serum biyobelirteç düzeylerinin hiçbirinde diğer 52 hasta ile fark gözlenmedi (Mann-Whitney U; Osteopontin p=0,514, Endoglin p=0,09, Angiogenin p=0,913, IGFBP-3 p=0,384, VEGF p=0,886, sVEGFR-1 p=0,845 ve Student T Testi VEGFR-2 p=0,114).Tümörlerin köken aldığı larinks bölgesine bakıldığında 40 hasta (%66,6) glottik 20 hasta (%33,3) supraglottik bölge kaynaklı idi. Köken alınan bölge ile araştırılan moleküller arasında bir ilişki saptanmadı (Mann-Whitney U; Osteopontin p=0,259, Endoglin p=0,163, Angiogenin p=0,210, IGFBP-3 p=0,485, VEGF p=0,625, sVEGFR-1 p=0,334 ve VEGFR-2 p=0,984).Lokal rekürrens 10 vakada (%16,6) izlenmiştir. Osteopontin ve sVEGFR-1 düzeyleri lokal rekürrensi olan vakalarda anlamlı olarak yüksektir (p=0,034 ve p=0,038). Diğer moleküllerle anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Kandaki araştırılan biyobelirteç adayı moleküllerin en yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip eşik düzeylerini belirlemek amacıyla ROC *(Receiver Operating Characteristic)* analizi yapılıp eğri çizilmiştir (Şekil 4.8). ROC analizi sonrası bulunan sensitivite ve spesifite değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8- Çalışılan moleküller için çizilen ROC eğrileri

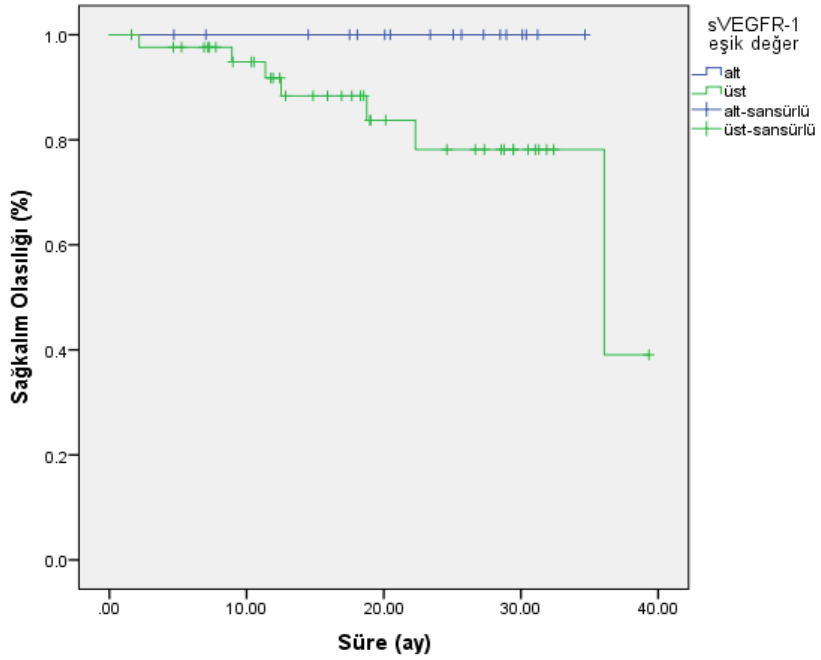
Tablo 4.2- ROC analizi sonrası bulunan eşik değerler ve duyarlılık/özgüllükdeğerleri

	Eğri altında kalan alan	P	%95Güven Aralığı		Belirlenen eşik değer (pg/ml)	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
			Alt Sınır	Üst Sınır			
Osteopontin	0,786	<0,001*	0,683	0,888	57705	71,2	65
Endoglin	0,427	0,329	0,282	0,572	-	-	-
Angiogenin	0,547	0,528	0,407	0,688	-	-	-
IGFBP3	0,919	<0,001*	0,859	0,980	14787,5	81,4	80
VEGF	0,784	<0,001*	0,668	0,900	183	78	75
sVEGFR-1	0,719	0,004*	0,564	0,874	85	72,9	65
VEGFR2	0,753	0,001*	0,635	0,872	8875	76,3	70

*İstatistiksel olarak anlamlı

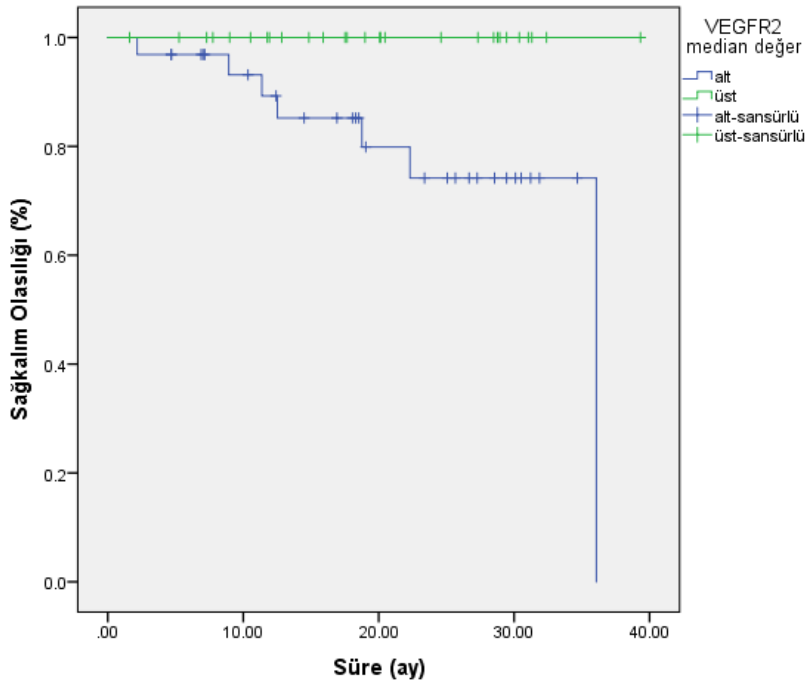
Bulunan eşik değerlerin üstü ve altındaki hastaların değerlerinin farklı olduğu 5 molekül (Osteopontin,IGFBP3, VEGF, sVEGFR-1 VE VEGFR-2) için daha detaylı araştırma yapılarak TNM, hastalık evresi, rekürrens ve lenf nodu metastazı oranı açısından incelendi. Angiogenin ve Endoglin için inceleme yapılmadı. Osteopontin,VEGFR2 ve IGFBP3 için bakılan parametrelerin hiçbirinde anlamlılık gösterilemedi. VEGF incelendiğinde eşik değerin üstünde olanların anlamlı derecede ileri evrede olduğu görüldü (p=0,028). sVEGFR-1 'ın eşik değer üstündeki hastaların anlamlı derecede T evresinin ileri olduğu ve rekürrens oranının daha yüksek olduğu görüldü (p=0,038 ve p=0,031).

Sağkalım analizi yapıldığında 1 yıllık ve 2 yıllık sağkalım oranı sırasıyla %92 ve %85,5olarak bulunmuştur. Araştırılan biyobelirteç adayı moleküllerin eşik değerlerinin üstü ve altındaki hastaların sağkalım analizleri yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir (Kaplan-Meier, log rank; Osteopontin p=0,669, IGFBP3 p=0,727, VEGF p=0,871, sVEGFR-1 p=0,076, VEGFR-2 p=0,382) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9- sVEGFR-1 için eşik değer üstü ve altındaki hastaların sağkalım oranı gösterilmiştir

Median değerlerin üstü ve altında kalan değerler sağkalım açısından karşılaştırıldığında VEGFR2 dışında anlamlı fark izlenmemiştir. VEGFR2 düşük olan hastaların sağkalım olasılığı yüksek olanlara göre daha düşüktür. (Kaplan-Meier, log rank; Osteopontin p=0,310, IGFBP3 p=0,189, VEGF p=0,809, sVEGFR-1 p=0,191 VEGFR-2 p=0,012) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10- VEGFR2 median değer üstü ve altındaki hastaların sağkalım olasılığı gösterilmiştir. VEGFR2 değeri yüksek olan hastaların sağkalım olasılığı daha yüksektir.

5.TARTIŞMA

Baş boyun skuamöz hücreli karsinomu 6. en sık görülen malignite olup önemli bir morbidite ve mortalite kaynağıdır(4, 5). Kanser ilişkili ölümlerin %2'sini oluşturmaktadır ve 5 yıllık sağkalımı evre ve lokalizasyona bağlı olmakla birlikte %60 civarındadır (102).Tanı ve tedavide uygulanan cerrahi eksizyon, kemoradyoterapiyi de içeren larinks koruyucu yöntemler ve multidisipliner yaklaşıma rağmen halen hastaların önemli bir kısmı rekürrens veya metastazlardan kaybedilmektedir (103). Tanı ve tedavide gelişen teknolojik imkanlar ve multidisipliner yaklaşıma rağmen mortalite oranlarında anlamlı iyileşme olmaması, erken tanı ve tedavi takibinde güvenilir ve doğru biyobelirteç ihtiyacını doğurmaktadır. Aynı klinik evrede ve aynı tedavi protokolü uygulanan iki hastanın prognozlarının farklı olabildiği göz önüne alındığında klinik evreler dışında moleküler düzeyde farklar olabileceğini akla getirmektedir. Şu ana kadar klinik kullanıma girmiş bir herhangi bir biyobelirteç molekül yoktur ancak epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörü olan cetuximab'ın klinik kullanımdaki başarısı, patogenez yolaklarında ilişkili olabilecek farklı moleküller ve inhibitörlerinin araştırılması için umut vermektedir.

Anjiyogenez tümör gelişimi için kritik basamaklardan biridir ve tümörün büyümesi ve metastaz kapasitesi için kritiktir. Tümör anjiyogenez olmadan 1-2 mm^3 'den fazla büyüyememektedir. Anjiyogenezin görülebilmesi için proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki dengenin bozulması ve proanjiyogenik faktörlerin baskın hale gelmesi gerekir ve bu duruma 'anjiyogenik dönüşüm *(switch)*' denir(104). Bu mekanizmaya etki eden faktörler ve moleküllerin tespiti ve analizi fikri kanserde tümör prognozuyla ilişkili çalışmaların yapılmasını sağlamıştır.

IGFBP-3, IGF'nin serumdaki major bağlayıcı proteinidir ve IGF'nin reseptörüyle bağlanma ilişkisini regüle eder (95). Bu sayede anjiyogenez ve apoptoz üzerine etkili olabileceği öne sürülmektedir.IGF'e serumda bağlanarak aktivitesini düşürdüğünden dolayı bazı kanserli hastalarda IGFBP-3'ün azalmış ancak IGF'nin artmış olarak bulunabileceği önerilmektedir(105). Ancak aynı zamanda bu bağlanmanın IGF'nin yarı ömrünü artırabileceği ve kanserli hastalarda bu durumun negatif etkili olabileceği iddia edilmektedir (106).Brady ve arkadaşları ise oral kanserli hastalarda serumda dolaşan hem IGF hem de IGFBP-3 miktarının düşük olduğunu göstermiştir (107). Çalışmamızda ise IGFBP-3 düzeyinin larinks SCC hasta

grubunda kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir.Ancak T,N,M evresi ve klinik evre, reküranhastalık ve anatomik bölgeye göre herhangi bir farklılık izlenmemiştir. IGFBP-3 yüksekliğinin kanserde artmış IGF aktivitesine yönelik kompansasyon mekanizması olabileceği düşünülebilir ancak çalışmamızda IGF düzeyleri ölçülmediğinden yorum yapmak için yeterli veri yoktur. 2010'de Meyer ve ark. tarafından yayınlanan 540 baş-boyun kanserli hasta kohortunda, serumIGF1R ve IGFBP-3 düzeylerinin herhangi bir klinik parametre ile anlamlı düzeyde ilişkisi saptanamamıştır (108). Zhi ve ark. ise baş boyun kanserli 41 hastada yaptıkları çalışmada, larinks kanseri hastalarında oral ve farinks kanserli hastaların aksine, kanserli dokularda normal dokuya göre IGFBP-3 mRNA düzeyinin arttığını göstermiş ve bunun IGF üzerinde regulatuar rolü olabileceğini öne sürmüştür(106). Aynı zamanda oral SCC'lerde de kanserli dokuda IGFBP-3 Mrna düzeyinin arttığı ancak IGFBP-3'ün IGF bağımsız olarak hücre migrasyonu ve lenf nodu metastazını artırabildiğine yönelik çalışmalar da mevcuttur (109).

IGF-bağımsız etki mekanizmalarından birinin IGFBP-3'ün hücre yüzeyinde bulunan serin-treonin V TGF-B reseptörüne bağlanarak büyümeyi inhibe edici şekilde olabileceği iddia edilmektedir(110). Bir başka IGF bağımsız mekanizmanın ise IGFBP-3'ün VEGF'yi baskılayarak baş boyun kanserlerinde tümör anjiyogenezini azaltabileceği öne sürülmektedir (92). Buna karşın bazı çalışmalarda ise IGFBP-3'ün nitrik oksit üzerinden veya *in vitro* olarak proanjiyogenikgenlerin ifadelenmesini artırarak anjiyogenez lehine etki göstermektedir (100, 101). Aynı molekülün hem proanjiyogenikhem de anti anjiyogeniközelliklerinin olması ilginçtir. IGFBP-3'ün invaziv kapasite ve hücre motilitesini artırıcı özelliği ise melanoma ve baş-boyun tümörlerinde gösterilmiştir (111, 112). Bu karşıt etkili IGFBP-3'ün hem apoptozu hem de proliferasyonu etkileyen ikili etkisinden kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (113). Martin ve ark. ise IGFBP-3'ün prostat kanserinde EGFR'yi uyararak büyümeyi stimüle ettiğini göstermiştir (114). IGFBP-3'ün baş-boyun kanserlerinde hücre adezyonu üzerine etkisini Lee ve ark. göstermiştir ve integrinB4 üzerinden adezyonu inhibe ettiği ve anti-tümör özellik gösterebileceği öne sürülmüştür (99).

Çalışmamızda yükselmiş serum IGFBP-3 düzeylerinin (14787,5pg/ml<)%81,4 duyarlılıkve %80 özgüllükile hastalığa tanı koydurucu olduğu görülmüştür ve bu

değerlerin çalışmada araştırılan moleküller arasındaki en yükseği olduğu saptanmıştır. Bu değerin tespiti hastalık tanısında yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Matuschek ve ark. ise baş boyun kanserinde tedavi öncesi ve sonrası bakılan IGFBP-3 için kontrollerle anlamlı fark gösteremez iken IGFBP-2'nin %73 duyarlılıkve %75 özgüllükile anlamlı farklı olduğunu bulmuş ancak bu değerlerin tümör belirteci olmak için yeterli olmadığını öne sürmüştür (115).Literatürdeki IGFBP-3 ile ilgili tüm bu çelişkili sonuçların homojen olmayan hasta kohortları nedeniyle oluşabileceği, hem farklı kanser tiplerine göre hem de baş boyun kanserlerinin alt tiplerine göre oluşabilecek varyasyonlar sebebiyle veya IGFBP-3'ün henüz net ortaya konulamayan etkileri sebebiyle oluşabileceği düşünülmektedir.

Osteopontin daha çok kemik matrikste bulunan, hücre adezyonu, migrasyon, proliferasyon ve invazyonda rolü olan, sekrete edilen bir fosfoproteindir (83, 116).Larinkskanseri öncüsü displastik lezyonların kansere progresyonunda ifadelendiğinin arttığı gösterilmiştir(69). Çalışmamızda larinks kanseri grubunda serum osteopontin düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu tespit edildi. Ancaklokalreküranshariç herhangi bir klinikopatolojik özellikle ilişki gösterilemedi. Lu ve ark. laringeal ve hipofaringeal kanserli hastalarda ostopontinin doku ekspresyonunu inceledikleri bir çalışmada normal dokuya göre artmış ekspresyon gözlemişler ve lenf nodu metastazıyla ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (117). Li ve ark. ise yine larinks ve hipofarinks tümörlerini içeren çalışmada benzer olarak plazma osteopontin düzeyleri kontrollere göre yüksek bulmuştur (116).O çalışmadaki sağkalım, lenf nodu metastazı, tümör differansiyasyonu ile olan anlamlı ilişki bizim çalışmamızda gösterilememiştir. Literatürdeki tüm osteopontin ve kanser ilişkili çalışmaları inceleyen bir meta-analizde yüksek osteopontin düzeyleri ile TNM evresi ve hastalık evresiarasında doğru,sağkalım arasında ters ilişki olduğu saptanmıştır(83). Çalışmadaki baş-boyun kanserleri incelendiğinde de bu ilişkinin kısmen devam ettiği gözlenmiştir.Bu üç çalışma da sadece larinks kanserlerini incelememektedir ve hasta grubu bizim çalışmamıza göre heterojendir. Ayrıca meta-analizde sadece serum düzeyi değil doku ekspresyonu da çalışıldığı için farklı sonuçlar elde edilmiş olabileceği değerlendirilmektedir.

Bizimçalışmamızda osteopontin düzeyinin lokalreküranslailişkili olduğu bulunmuştur ancak sağkalım açısından osteopontin düzeylerinin anlamlı etkisi gösterilememiştir.Polat ve ark. yaptığı bir çalışmada baş-boyun kanserli vakaların

kontrol grubuna göre bizim çalışmamızdaki gibi daha yüksek Osteopontin düzeyleri olduğu gözlenmiştir. Ayrıca sağkalım açısından cerrahiye uygun hastaların median değer altı değere sahip olanların sağkalım açısından avantajlı olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadığı gözlenmiştir (82). Cerrahiye uygun olmayan veya cerrahi+adjuvan radyoterapi uygulanan hastalarda ise sağkalım açısından osteopontinin prognostik rolü olduğu iddia edilmektedir (82). Bizim çalışmamızda da median değer altı olan hastalar sağkalım açısından daha avantajlı olsa da istatistiksel anlamlılık izlenmemiştir. 578 adet evre 3-4 baş boyun kanserli hastanın dahil edildiği bir başka çalışmada da plazma osteopontin düzeylerinin genel ve hastalıksız sağkalım üzerine herhangi bir prognostik etkisi olmadığı gösterilmiştir (118). Buna karşın Li ve ark. hem doku ekspresyonu hem de plazma düzeyi yüksek olan hastaların sağkalım ve uzak metastaz açısından dezavantajlı olduğunu öne sürmüştür (116). Ancak osteopontinin tümör dışında yara iyileşmesi ve kemik yapım-yıkımı ile ilişkisi göz önüne alındığında ve sağkalımı etkileyen başka faktörler düşünüldüğünde osteopontinin prognostik önemi açısından daha geniş kapsamlı ve homojen hasta grupları içeren prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Endoglin (CD105) TGF-β reseptör kompleksinin üyesi olan hücre membranı glikoproteinidir. TGF-β ise proliferasyon, migrasyon ve differansiasyon üzerine olan etkileriyle anjiyogenezin modülasyonunda rol alır (54). Endoglinin aktif anjiyogenikaktivite gösteren endotelyal hücreler spesifite gösterdiği ve tümör damarlanması üzerine diğer pan-endotelyal moleküllere (CD31,CD34,Faktör VIII) göre daha üstün olduğu öne sürülmüştür (119). Daha önce yapılan birçok farklı kanserlerdeki çalışmalarda Endoglinin intratümöral mikro damar yoğunluğu (MDY) üzerine önemli bir prognostik belirteç olabileceği gösterilmiştir (53). İntratümöral MDY tümörde meydana gelen anjiyogenezin yoğunluğuna işaret etmektedir. Baş boyun kanserleri ve larinks kanseri üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde bu çalışmaların immünohistokimya ile MDY değerlendirmesi etkilerini araştırdığı izlenmiştir.

Zvrko ve ark. 80 larinks SCC'yi içeren hastada yaptıkları çalışmada yüksek endoglin ilişkili MDY'nin ileri T evresi, ileri hastalık evresi, rekürrens ile pozitif korelasyonu gösterilmiştir (120). Yüksek Endoglin ekspresyonunun aynı zamanda hastalıksız sağkalım için bağımsız kötü prognostik etkisi olduğu öne sürülmüştür. Yüksek endoglin ekspresyonu ilişkili MDY'nin ileri hastalık evresi ve rekürrensle olan

ilişkisinin, supraglottik larinks kanserlerini inceleyen bir başka çalışmada da devam ettiği gözlenmiştir (53). 2014 yılında 65 yaş üzeri larinks kanserlerini inceleyen bir başka çalışmada da yüksek endoglin ekspresyonun negatif prognostik etkisi teyid edilmiştir (121). Marioni ve ark. yaptıkları, larinks SCC hastalarını inceleyen 2006 yılına ait bir çalışmada endoglin ilişkili MDY'nin artmış lokal-bölgeselreküransiçin bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (49). Bizim çalışmamızda ise lokal rekürrens ile ilgili herhangi bir ilişki gösterilememiştir. Szafarowski ve ark. opere edilen baş boyun kanserli hastaları kontrol grubu ile karşılaştırdıkları bir çalışmda ise MDY değerlerinin sağlıklı gönüllülere göre hasta grubunda anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir (122). Ancak diğer çalışmalarda olan ileri evre ile olan pozitif korelasyon burda negatif olarak izlenmiştir. Bizim çalışmamızda sağlıklı gönüllüler ile hasta grubu arasında serum endoglin seviyeleri açısından herhangi bir fark izlenmemiştir. Ayrıca T evresi, N evresi, metastatik hastalık, hastalık evresi, rekürrens durumu ile herhangi bir ilişki saptanmamıştır. ROC analizi ile de anlamlı sensitivite ve spesifite değerleri bulunamadığından sağkalım açısından değerlendirme yapılmamıştır. Literatürde immünohistokimyasal olarak endoglin kullanılarak yapılan MDY değerlendirmesinin baş boyun ve larinks kanserlerinde klinik olarak anlamlı olabilecek etkilerine dair kanıtlar mevcuttur. Bizim çalışmamızda kullandığımız ELISA yönteminin kana dökülme (*shedding)* ile kana geçen hücre membran proteinlerini tespit edebildiği göz önüne alındığında, endoglin farkının doku düzeyinde anlamlı olduğu sonucu çıkarılabilir. Kullandığımız yöntem ile kana geçen anlamlı olarak fazla endoglin molekülü olmadığının tespiti ile ilerideki çalışmaların immünohistokimya üzerinden yapılmasının daha faydalı olabileceği önerilebilir.

Angiogenin vasküler endotel hücrelerine affinitesi olan, etki göstermesi için nükleusta akümüle olması gereken bir ribonükleaz ailesi üyesidir. Anjiyogenezin potent bir stimülatörüdür ve hipoksik ortamda ifadelenmesi artarak tümörün artan boyutu için kompanzasyon sağlar(123, 124). Literatürdeki baş boyun kanserleri ve larinks kanseri özelindeki çalışmaların büyük çoğunluğunda immünohistokimya methodu kullanılmıştır. Marioni ve ark. yaptığı bir çalışmada angiogenin ekspresyonunun TNM evresi ve hastalık evresi ile herhangi bir anlamlı korelasyonu gösterilememiş ancak rekürrens ve azalmış hastalıksız sağkalım ile ilişkisi bulunmuştur(125). Aynı ekibin 2011 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise sadece N evresi ile anlamlı ilişki gözlenmiş ve diğer tüm klinikopatolojik ve sağkalım ile ilişkili

parametrelerde korelasyon izlenmemiştir(123). Yine aynı ekibin 2013 yılında açık parsiyel larinjektomi geçiren hastalarda yaptıkları bir çalışmada, angiogenin ekspresyonunun T evresi, N evresi, hastalıksız sağkalım ve rekürrensle herhangi bir ilişkisi gözlenmemiştir(35). 2015 yılında 76 laringeal SCC olan hastayı inceleyen bir başka çalışmada ise yüksek angiogenin ekspresyonunun artmış lokorejyonel rekürrens risk ve azalmış hastalıksız sağkalım ile ilişkisi gözlenmiştir(46). Bizim çalışmamızda ise angiogeninin hasta grubu ile kontroller arasında anlamlı olarak fark izlenmemiştir. Literatürdeki yukarıda sunulan bazı çalışmalara benzer şekilde T ve N evresi, rekürrens ve metastatik hastalıkla herhangi bir ilişki gösterilememiştir. Hastalık tanısında ROC analizi sonunda angiogenin yine anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla immünohistokimya kullanılması nedeniyle bizim çalışmamızla arasında metod farkı mevcuttur ve hasta grupları heterojendir. Metod olarak bizim çalışmamıza benzer şekilde baş boyun kanserli hastalarda kanda dolaşan anjiyogenikmoleküllerin kontrol grubuyla karşılaştırıldığı 2002 yılına ait bir çalışmada ise, bizim çalışmamızda olduğu gibi kandaki angiogenin seviyesinin hasta ve kontrol grubuyla farkı izlenmemiştir(126). Ayrıca TNM evresi ve tümör derecesi ile yine çalışmamıza benzer şekilde ilişki gözlenmemiştir. İlginç olarak rekürrensi olan vakalarda angiogenin seviyesi anlamlı olarak daha düşük olarak bulunmuştur ve bu durum, bizim çalışmamız da dahil, yukarıda ifade edilen bazı çalışmalarla farklılık göstermektedir. Angiogeninin kan düzeyinin belirgin olarak farklılık göstermemesi, etkisinin daha çok parakrin veya otokrin olarak görüldüğü ve kanda dökülme(shedding) etkisi ile belirgin olarak farklı olmadığı speküle edilebilir.

VEGF anjiyogenez ve vasküler permeabilitenin major regülatörü olup, baş boyun kanserleri patogenezinde önemli rol oynamaktadır (127, 128). VEGF bir sinyal proteini olup anjiyogenezin ana stimülatörüdür(129). Hem embriyolojik hayatta hem de daha sonrasında fizyolojik ve patolojik durumlarda rol oynamaktadır (129). Hipoksinin VEGF ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir ve bu durum tümörlerin içindeki nekrotik ve hipoksik alanların içinde olmaktadır(130). Baş boyun SCC'lerinin %90'ından fazlası VEGF ve onun reseptörleri olan VEGFR1-3'ü eksprese ederler(127, 128). VEGF ekspresyonunu hipoksi haricinde sitokinler,onkogenler ve tümör supresor genler de regüle ederler(131). Aktif VEGF'nin regülasyonu ise çözünebilen

VEGFR-1 tarafından ligandı yakalama*(trapping)* ile sağlanır(132). sVEGFR-1 fizyolojik koşullarda (örn. egzersiz) artıp egzersiz sırasında artmış olan VEGF düzeyini normale getirdiği gibi patolojik koşullarda (örn. kanser) VEGF ile birlikte eksprese olabilir(133-136). VEGF ile baş boyun tümörlerinin ilişkisi literatürde çelişkilidir(137, 138). Sullu ve ark. immünohistokimya kullanarak yaptıkları larinks kanserlerini inceleyen bir çalışmada VEGF'nin tümör çapı, tümör differansiasyonu ve lenf nodu metastazı gibi klinikopatolojik tümör özellikleri ile anlamlı ilişkili olduğu gösterilmiştir(139). Bizim çalışmamız ve bazı diğer çalışmalarda ise herhangi bir klinikopatolojik bulgu ile VEGF korelasyonugösterilememiştir(137). 2012 yılında yapılan baş boyun kanserli hastaların normal kontrollerle karşılaştırıldığı bir çalışmada hem plazma VEGF hem de plazma sVEGFR-1 düzeyinin baş boyun kanserli hastalarda anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir(140). Bu bulgular bizim yaptığımız çalışmada da teyid edilmiştir. Larinks kanserlerini inceleyen bir başka çalışmada erken evre ve ileri evre tümörlerde VEGF düzeyleri açısından fark gösterilememiştir(141). Yine larinks kanserli hastaları immünohistokimya ile inceleyen 2018 yılına ait bir çalışmada ise VEGF'nin erken evre tümörlerde prognostik olduğu ileri evrede ise prognostik öneminin olmadığı bulunmuştur. Ayrıca N evresi ile ilişki gösterilememiştir(142). Bonhin ve ark. ileri evre larinks kanseri olan olgularda VEGF ile lenf nodu metastazı arasında herhangi bir ilişki gösterememiştir(143). Wang ve ark. ise larinks kanserinde VEGF ile lenf nodu metastazı arasında ilişki göstermiştir(144). Bizim çalışmamızda ise hastalık evresi ve N evresi ile VEGF arasında bir ilişki gösterilememiştir. Bu bulgular literatürdeki bazı yayınlarla uyumludur ancak hali hazırda konu hakkında çelişkiler devam etmektedir.

VEGF ile reseptörlerin ilişkisinin daha önce tümör ve stromal hücrelerden salınan VEGF'nin parakrin etkisi ile olduğu düşünülmekteydi. Ancak Tong ve ark. baş boyun tümör hücresinin otokrin etki ile VEGF\VEGFR aksını aktive edebildiğini ve bu sayede proliferasyon ve invaziv fenotip kazandığını göstermiştir(145). İmmünohistokimyasal olarak yapılan bir çalışmada yüksek VEGF ekspresyonunun yüksek VEGFR2 ile korelasyon gösterdiği ancak VEGFR-1 ile korelasyon göstermediği, yüksek VEGFR1'in ise VEGFR2 ile korele olduğu gösterilmiştir (146). Bizim

çalışmamızda da benzer şekilde VEGF'nin VEGFR-2 ile korelasyon gösterdiği ancak VEGFR-1 ile korele olmadığı bulunmuştur. Önceki çalışmalardaki VEGFR1 ile 2 arasındaki anlamlı korelasyon bizim çalışmamızda gösterilememiştir. VEGFR ekspresyonu hem metastaz ve kötü prognozla buna karşıt olarak hem de iyi prognozla ilişkilendirilmiştir(147-151). Baş boyun kanserlerinde VEGFR1 ve 3 kötü prognoz, tümör rekürrensi ve lenf nodu metastazı ile ilişkiliyken VEGFR2 invazivlik ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir(152, 153). Baş boyun hücre kültüründe epigenetik değişiklikleri inceleyen Misawa ve ark. yaptığı bir çalışmada VEGFR1-3 mRNA düzeylerinin normal dokuya göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir (154). Genetik düzeydeki bu fark bizim çalışmada da in vivo kan düzeylerinde anlamlı olarak yüksek görülmüştür. *In vivo* ve *in vitro* hücre kültürü kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise VEGFR2 ortadan kaldırılmasıyla (*knock-down)* ile baş boyun kanseri tümör hücrelerinin invazyon ve migrasyon kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir ve bu durumun metastazda kritik rol oynayabileceği öne sürülmektedir(155). *In vitro* yapılan başka bir çalışmada da VEGFR1-3 genlerinde mutasyon olan vakaların genel sağkalım oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir(156). Bizim çalışmamızda sVEGFR-1'in lokalrekürans ile ilişkili olduğu ve ayrıca bulunan eşik değer üstündeki hastaların anlamlı olarak ileri evre olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da sVEGFR-1 eşik değer üstündeki hastaların sağkalımı daha kötüdür. Pentheroudakis ve ark. yaptığı çalışmada da yüksek sVEGFR-1 mRNA düzeyi olan hastaların hem hastalıksız sağkalım hem de genel sağkalım oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir(157). Ayrıca bizim çalışmamıza benzer şekilde sVEGFR-1 yüksek tümörlerin lokorejyonal relaps ile ilişkili olduğu görülmüştür(157). Median değer üstündeki VEGFR-2 değerleri olan hastalar çalışmamızda genel sağkalımda daha iyi olarak bulunmuştur. Bu bulgular yüksek VEGFR-2 ile sağkalım açısından literatürdekibazı çalışmalarla çelişmektedir(146).

6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1) OPN, VEGF, sVEGFR-1, VEGFR-2, IGFBP-3 serum düzeyleri larinks SCC hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir.

2) CD105ve ANGserum düzeylerinde hasta grubu ve kontrol grubu arasında fark izlenmemiştir.

3) TNM evresi ve klinik evre ile herhangi bir biyobelirteç adayı molekül arasında anlamlı fark izlenmemiştir.

4) Hasta grubunda lokal rekürrens 10 vakada (%16,6) izlenmiştir. Osteopontin ve sVEGFR-1 düzeyleri lokal rekürrensi olan vakalarda anlamlı olarak yüksektir. Diğer moleküllerle anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

5) Tanısal duyarlılık ve özgüllük açısından %80'in üzerine çıkan tek molekül IGFBP-3 olmuştur. Angiogenin ve endoglin istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Diğer moleküllerin duyarlılık ve özgüllük aralığı %65-78 arasında değişmektedir. Bu haliyle klinikte kullanım açısından IGFBP-3 umut vaad etmektedir.

6)VEGF incelendiğinde eşik değerin üstünde olanların anlamlı derecede ileri evrede olduğu görülmüştür. sVEGFR-1 'ın eşik değeri üstündeki hastaların anlamlı derecede T evresinin ileri olduğu ve rekürrens oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. sVEGFR-1 'in hem rekürrens olan vakalarda yüksek olması ve eşik değer üstündeki vakalarda daha yüksek rekürans izlenmesi takipte hedeflenmesi gereken bir molekül olabileceğini işaret etmektedir.

7) 1 yıllık ve 2 yıllık sağkalım oranı sırasıyla %92 ve %85,5 olarak bulunmuştur. sVEGFR-1'in eşik değer üstü değerleri VEGFR-2'nin ise median değer altındaki değerleri sağkalım açısından kötü prognostik etkiye sahiptir. Bu moleküllerin değerlendirilmesinin sağkalım açısından prognostik önemi olabileceği değerlendirilmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. Head Neck. 2009;31(6):748-58.

2. Thomas L, Drinnan M, Natesh B, Mehanna H, Jones T, Paleri V. Open conservation partial laryngectomy for laryngeal cancer: a systematic review of English language literature. Cancer Treat Rev. 2012;38(3):203-11.

3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, et al. Cancer statistics, 2006. CA: a cancer journal for clinicians. 2006;56(2):106-30.

4. India Project Team of the International Cancer Genome C. Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups. Nat Commun. 2013;4:2873.

5. Wang Z, Wu VH, Allevato MM, Gilardi M, He Y, Luis Callejas-Valera J, et al. Syngeneic animal models of tobacco-associated oral cancer reveal the activity of in situ anti-CTLA-4. Nat Commun. 2019;10(1):5546.

6. Alsahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. Cell Death Dis. 2019;10(8):540.

7. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. Cancer Treat Rev. 2006;32(7):504-15.

8. Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M, Jr., Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. Head Neck. 2011;33(4):581-6.

9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61(5):759-67.

10. Gale N, Gnepp DR, Poljak M, Strojan P, Cardesa A, Helliwell T, et al. Laryngeal Squamous Intraepithelial Lesions: An Updated Review on Etiology, Classification, Molecular Changes, and Treatment. Adv Anat Pathol. 2016;23(2):84-91.

11. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer research. 1996;56(11):2488-92.

12. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, Zabalza I, Alfaro J, Rezola R, et al. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. The Laryngoscope. 2003;113(1):167-72.

13. Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Johansson R, Haapasalo H, Marin S, et al. p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1997;15(9):3111-20.

14. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. Eur J Cancer. 2005;41(5):683-93.

15. Vlachtsis K, Nikolaou A, Markou K, Fountzilas G, Daniilidis I. Clinical and molecular prognostic factors in operable laryngeal cancer. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2005;262(11):890-8.

16. Pignataro L, Sambataro G, Pagani D, Pruneri G. Clinico-prognostic value of D-type cyclins and p27 in laryngeal cancer patients: a review. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2005;25(2):75-85.

17. Amin MB, Edge, S., Greene, F., et al, eds. AJCC Cancer Staging Manual. New York: Springer; 2017.

18. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. The New England journal of medicine. 1971;285(21):1182-6.

19. Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, et al. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985;82(19):6507-11.

20. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochemical and biophysical research communications. 1989;161(2):851-8.

21. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 1996;86(3):353-64.

22. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. J Investig Dermatol Symp Proc. 2000;5(1):24-33.

23. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science. 1994;265(5178):1582-4.

24. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003;9(6):669-76.

25. Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE. Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. Oncogene. 2005;24(6):1043-52.

26. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. Nature. 2006;441(7092):437-43.

27. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(5):359-71.

28. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. J Cell Biol. 2003;161(6):1163-77.

29. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. Genes & development. 2002;16(20):2684-98.

30. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature. 1996;380(6573):435-9.

31. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2002;2(3):161-74.

32. Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! J Exp Med. 2001;193(6):F23-6.

33. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. Biochemistry. 1985;24(20):5480-6.

34. Gao X, Xu Z. Mechanisms of action of angiogenin. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2008;40(7):619-24.

35. Marioni G, Staffieri A, Hagen R, Ottaviano G, Lionello M, Staffieri C, et al. Prognostic value of hypoxia-inducible factors (angiogenin and endoglin) in open partial laryngectomies: uni- and multivariate analyses. Am J Otolaryngol. 2013;34(1):3-9.

36. Badet J, Soncin F, Guitton JD, Lamare O, Cartwright T, Barritault D. Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989;86(21):8427-31.

37. Chen L, Hu GF. Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma. Oral oncology. 2010;46(9):648-53.

38. Hu GF, Chang SI, Riordan JF, Vallee BL. An angiogenin-binding protein from endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991;88(6):2227-31.

39. Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94(6):2204-9.

40. Hu GF. Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(17):9791-5.

41. Ibaragi S, Yoshioka N, Kishikawa H, Hu JK, Sadow PM, Li M, et al. Angiogenin-stimulated rRNA transcription is essential for initiation and survival of AKT-induced prostate intraepithelial neoplasia. Molecular cancer research : MCR. 2009;7(3):415-24.

42. Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Hu GF, Sasaki A. Neamine inhibits oral cancer progression by suppressing angiogenin-mediated angiogenesis and cancer cell proliferation. Anticancer Res. 2014;34(5):2113-21.

43. Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Hu GF, et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. Oral oncology. 2012;48(11):1120-7.

44. Shibata A, Ibaragi S, Mandai H, Tsumura T, Kishimoto K, Okui T, et al. Synthetic Terrein Inhibits Progression of Head and Neck Cancer by Suppressing Angiogenin Production. Anticancer Res. 2016;36(5):2161-8.

45. Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA, Hu GF. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. Oncogene. 2005;24(3):445-56.

46. Lovato A, Lionello M, Staffieri A, Blandamura S, Tealdo G, Giacomelli L, et al. A Higher Angiogenin Expression is Associated With a Nonnuclear Maspin Location in Laryngeal Carcinoma. Clin Exp Otorhinolaryngol. 2015;8(3):268-74.

47. Sadagopan S, Veettil MV, Chakraborty S, Sharma-Walia N, Paudel N, Bottero V, et al. Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. Oncogene. 2012;31(46):4835-47.

48. Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, Tsuji T, Hu GF. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(39):14519-24.

49. Marioni G, Ottaviano G, Giacomelli L, Staffieri C, Casarotti-Todeschini S, Bonandini E, et al. CD105-assessed micro-vessel density is associated with malignancy recurrence in laryngeal squamous cell carcinoma. European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology. 2006;32(10):1149-53.

50. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. J Transl Med. 2004;2(1):18.

51. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. Cytokine Growth Factor Rev. 1997;8(1):21-43.

52. Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, et al. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. The Journal of biological chemistry. 2006;281(35):25110-23.

53. Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L. CD105 expression as a measure of microvessel density in supraglottic laryngeal squamous cell carcinoma. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2009;266(12):1971-6.

54. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. Oncogene. 2003;22(42):6557-63.

55. Marioni G, Giacomelli L, D'Alessandro E, Staffieri C, Guzzardo V, Staffieri A, et al. Laryngeal carcinoma recurrence rate and disease-free interval are related to CD105 expression but not to vascular endothelial growth factor 2 (Flk-1/Kdr) expression. Anticancer Res. 2008;28(1B):551-7.

56. Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L. Clinicopathologic significance of CD105-assessed microvessel density in glottic laryngeal squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx. 2010;37(1):77-83.

57. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, Sugita Y, Satoh T, Tokunaga O. Organ-specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. Pathol Int. 2006;56(12):717-23.

58. Li C, Issa R, Kumar P, Hampson IN, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, et al. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. J Cell Sci. 2003;116(Pt 13):2677-85.

59. Marioni G, Marino F, Giacomelli L, Staffieri C, Mariuzzi ML, Violino E, et al. Endoglin expression is associated with poor oncologic outcome in oral and oropharyngeal carcinoma. Acta Otolaryngol. 2006;126(6):633-9.

60. Marme D. Tumor Angiogenesis: A Key Target for Cancer Therapy. Oncol Res Treat. 2018;41(4):164.

61. Warren CM, Iruela-Arispe ML. Signaling circuitry in vascular morphogenesis. Curr Opin Hematol. 2010;17(3):213-8.

62. Roskoski R, Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. Biochemical and biophysical research communications. 2008;375(3):287-91.

63. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature. 2011;473(7347):298-307.

64. Schwartz JD, Rowinsky EK, Youssoufian H, Pytowski B, Wu Y. Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). Cancer. 2010;116(4 Suppl):1027-32.

65. Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8(3):212-26.

66. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. Cell. 1979;16(4):885-93.

67. Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1993;7(15):1475-82.

68. Eto M, Kodama S, Nomi N, Uemura N, Suzuki M. Clinical significance of elevated osteopontin levels in head and neck cancer patients. Auris Nasus Larynx. 2007;34(3):343-6.

69. Rodrigo JP, Garcia-Pedrero JM, Suarez C, Takes RP, Thompson LD, Slootweg PJ, et al. Biomarkers predicting malignant progression of laryngeal epithelial precursor lesions: a systematic review. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2012;269(4):1073-83.

70. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(3):973-8.

71. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(1):33-45.

72. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. Oncogene. 2009;28(38):3412-22.

73. Ruoslahti E. Integrins. The Journal of clinical investigation. 1991;87(1):1-5.

74. Kumar CC. Signaling by integrin receptors. Oncogene. 1998;17(11 Reviews):1365-73.

75. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. The American journal of pathology. 1996;149(1):293-305.

76. Hruska KA, Rolnick F, Huskey M, Alvarez U, Cheresh D. Engagement of the osteoclast integrin alpha v beta 3 by osteopontin stimulates phosphatidylinositol 3-hydroxyl kinase activity. Endocrinology. 1995;136(7):2984-92.

77. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. Exp Oncol. 2004;26(3):179-84.

78. Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. Curr Opin Cell Biol. 1996;8(5):724-30.

79. Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo. Cancer research. 1998;58(22):5206-15.

80. El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2006;17(6):463-74.

81. Meerovitch K, Bergeron F, Leblond L, Grouix B, Poirier C, Bubenik M, et al. A novel RGD antagonist that targets both alphavbeta3 and alpha5beta1 induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen. Vascul Pharmacol. 2003;40(2):77-89.

82. Polat B, Kaiser P, Wohlleben G, Gehrke T, Scherzad A, Scheich M, et al. Perioperative changes in osteopontin and TGFbeta1 plasma levels and their prognostic impact for radiotherapy in head and neck cancer. BMC cancer. 2017;17(1):6.

83. Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. British journal of cancer. 2010;103(6):861-9.

84. Chiodoni C, Colombo MP, Sangaletti S. Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis. Cancer Metastasis Rev. 2010;29(2):295-307.

85. Georgiadou P, Iliodromitis EK, Kolokathis F, Varounis C, Gizas V, Mavroidis M, et al. Osteopontin as a novel prognostic marker in stable ischaemic heart disease: a 3-year follow-up study. Eur J Clin Invest. 2010;40(4):288-93.

86. Lorenzen J, Shah R, Biser A, Staicu SA, Niranjan T, Garcia AM, et al. The role of osteopontin in the development of albuminuria. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2008;19(5):884-90.

87. McKee MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. Annals of the New York Academy of Sciences. 1995;760:177-89.

88. Ohmori R, Momiyama Y, Taniguchi H, Takahashi R, Kusuhara M, Nakamura H, et al. Plasma osteopontin levels are associated with the presence and extent of coronary artery disease. Atherosclerosis. 2003;170(2):333-7.

89. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. British journal of cancer. 2004;90(10):1877-81.

90. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. Cancer research. 1999;59(16):3915-8.

91. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. The EMBO journal. 1998;17(11):3005-15.

92. Oh SH, Kim WY, Lee OH, Kang JH, Woo JK, Kim JH, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 suppresses vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2012;103(7):1259-66.

93. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, Hashizume K. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. Endocr J. 1999;46 Suppl:S59-62.

94. Dunn SE, Hardman RA, Kari FW, Barrett JC. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. Cancer research. 1997;57(13):2687-93.

95. Kim WY, Kim MJ, Moon H, Yuan P, Kim JS, Woo JK, et al. Differential impacts of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in epithelial IGF-induced lung cancer development. Endocrinology. 2011;152(6):2164-73.

96. Platz EA, Pollak MN, Rimm EB, Majeed N, Tao Y, Willett WC, et al. Racial variation in insulin-like growth factor-1 and binding protein-3 concentrations in middle-aged men. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 1999;8(12):1107-10.

97. Oh SH, Whang YM, Min HY, Han SH, Kang JH, Song KH, et al. Histone deacetylase inhibitors enhance the apoptotic activity of insulin-like growth factor binding protein-3 by blocking PKC-induced IGFBP-3 degradation. International journal of cancer Journal international du cancer. 2012;131(10):2253-63.

98. Shahjee H, Bhattacharyya N, Zappala G, Wiench M, Prakash S, Rechler MM. An N-terminal fragment of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) induces apoptosis in human prostate cancer cells in an IGF-independent manner. Growth Horm IGF Res. 2008;18(3):188-97.

99. Lee HJ, Lee JS, Hwang SJ, Lee HY. Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits cell adhesion via suppression of integrin beta4 expression. Oncotarget. 2015;6(17):15150-63.

100. Granata R, Trovato L, Lupia E, Sala G, Settanni F, Camussi G, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 induces angiogenesis through IGF-I- and SphK1-dependent mechanisms. J Thromb Haemost. 2007;5(4):835-45.

101. Kielczewski JL, Jarajapu YP, McFarland EL, Cai J, Afzal A, Li Calzi S, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric oxide generation. Circ Res. 2009;105(9):897-905.

102. Canadian Cancer Society's Steering Committee for Canadian Cancer S, editor Canadian cancer statistics Canadian Cancer Society; 2009.

103. Lefebvre JL. Larynx preservation. Curr Opin Oncol. 2012;24(3):218-22.

104. Marmé D, N F. Tumor Angiogenesis. 1 ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2008.

105. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, et al. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3. Journal of the National Cancer Institute. 1999;91(7):620-5.

106. Zhi X, Lamperska K, Golusinski P, Schork NJ, Luczewski L, Golusinski W, et al. Expression levels of insulin-like growth factors 1 and 2 in head and neck squamous cell carcinoma. Growth Horm IGF Res. 2014;24(4):137-41.

107. Brady G, O'Regan E, Miller I, Ogungbowale A, Kapas S, Crean SJ. Serum levels of insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins (IGFBPs), -1, -2, -3, in oral cancer. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2007;36(3):259-62.

108. Meyer F, Samson E, Douville P, Duchesne T, Liu G, Bairati I. Serum prognostic markers in head and neck cancer. Clin Cancer Res. 2010;16(3):1008-15.

109. Yen YC, Hsiao JR, Jiang SS, Chang JS, Wang SH, Shen YY, et al. Insulin-like growth factor-independent insulin-like growth factor binding protein 3 promotes cell migration and lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma cells by requirement of integrin beta1. Oncotarget. 2015;6(39):41837-55.

110. Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor. The Journal of biological chemistry. 1997;272(33):20572-6.

111. Xi Y, Nakajima G, Hamil T, Fodstad O, Riker A, Ju J. Association of insulin-like growth factor binding protein-3 expression with melanoma progression. Molecular cancer therapeutics. 2006;5(12):3078-84.

112. Sun JM, Jun HJ, Ko YH, Park YH, Ahn YC, Son YI, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3, in association with IGF-1 receptor, can predict prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral oncology. 2011;47(8):714-9.

113. Oy GF, Slipicevic A, Davidson B, Solberg Faye R, Maelandsmo GM, Florenes VA. Biological effects induced by insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) in malignant melanoma. International journal of cancer Journal international du cancer. 2010;126(2):350-61.

114. Martin JL, Weenink SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-3 potentiates epidermal growth factor action in MCF-10A mammary epithelial cells. Involvement of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinases. The Journal of biological chemistry. 2003;278(5):2969-76.

115. Matuschek C, Rudoy M, Peiper M, Gerber PA, Hoff NP, Buhren BA, et al. Do insulin-like growth factor associated proteins qualify as a tumor marker? Results of a prospective study in 163 cancer patients. European journal of medical research. 2011;16(10):451-6.

116. Li Y, Li L, Wang JT, Kan X, Lu JG. Elevated content of osteopontin in plasma and tumor tissues of patients with laryngeal and hypopharyngeal carcinoma associated with metastasis and prognosis. Med Oncol. 2012;29(3):1429-34.

117. Lu JG, Li Y, Li L, Kan X. Overexpression of osteopontin and integrin alphav in laryngeal and hypopharyngeal carcinomas associated with differentiation and metastasis. J Cancer Res Clin Oncol. 2011;137(11):1613-8.

118. Lim AM, Rischin D, Fisher R, Cao H, Kwok K, Truong D, et al. Prognostic significance of plasma osteopontin in patients with locoregionally advanced head and neck squamous cell carcinoma treated on TROG 02.02 phase III trial. Clin Cancer Res. 2012;18(1):301-7.

119. Saad RS, Liu YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. Modern

pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2004;17(2):197-203.

120. Zvrko E, Mikic A, Vuckovic L, Djukic V, Knezevic M. Prognostic relevance of CD105-assessed microvessel density in laryngeal carcinoma. Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2009;141(4):478-83.

121. Lovato A, Marioni G, Manzato E, Staffieri C, Giacomelli L, Ralli G, et al. Elderly patients at higher risk of laryngeal carcinoma recurrence could be identified by a panel of two biomarkers (nm23-H1 and CD105) and pN+ status. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2015;272(11):3417-24.

122. Szafarowski T, Sierdzinski J, Szczepanski MJ, Whiteside TL, Ludwig N, Krzeski A. Microvessel density in head and neck squamous cell carcinoma. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2018;275(7):1845-51.

123. Marioni G, Blandamura S, Loreggian L, Koussis H, Lionello M, Giacomelli L, et al. Laryngeal carcinoma prognosis after postoperative radiotherapy correlates with CD105 expression, but not with angiogenin or EGFR expression. European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies. 2011;268(12):1779-87.

124. Dickson KA, Kang DK, Kwon YS, Kim JC, Leland PA, Kim BM, et al. Ribonuclease inhibitor regulates neovascularization by human angiogenin. Biochemistry. 2009;48(18):3804-6.

125. Marioni G, Marino F, Blandamura S, D'Alessandro E, Giacomelli L, Guzzardo V, et al. Neoangiogenesis in laryngeal carcinoma: angiogenin and CD105 expression is related to carcinoma recurrence rate and disease-free survival. Histopathology. 2010;57(4):535-43.

126. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. Circulating angiogenic cytokines as tumour markers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Otolaryngol Allied Sci. 2002;27(1):32-7.

127. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. Clin Cancer Res. 2005;11(4):1434-40.

128. Seiwert TY, Cohen EE. Targeting angiogenesis in head and neck cancer. Semin Oncol. 2008;35(3):274-85.

129. Hinerman RW, Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Villaret DB. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity: 35-year experience. Head Neck. 2004;26(11):984-94.

130. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1994;71(3):374-9.

131. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. Semin Cancer Biol. 2004;14(2):123-30.

132. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. J Biochem Mol Biol. 2006;39(5):469-78.

133. Yamaguchi T, Bando H, Mori T, Takahashi K, Matsumoto H, Yasutome M, et al. Overexpression of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in colorectal cancer: Association with progression and prognosis. Cancer Sci. 2007;98(3):405-10.

134. Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, Hornig C, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. International journal of cancer Journal international du cancer. 2002;98(1):14-8.

135. Chang YT, Chang MC, Wei SC, Tien YW, Hsu C, Liang PC, et al. Serum vascular endothelial growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ratio is an independent prognostic marker in pancreatic cancer. Pancreas. 2008;37(2):145-50.

136. Bailey AP, Shparago M, Gu JW. Exercise increases soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (sFlt-1) in circulation of healthy volunteers. Med Sci Monit. 2006;12(2):CR45-50.

137. Tae K, El-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. Clin Cancer Res. 2000;6(7):2821-8.

138. Bandoh N, Hayashi T, Takahara M, Kishibe K, Ogino T, Katayama A, et al. VEGF and bFGF expression and microvessel density of maxillary sinus squamous cell carcinoma in relation to p53 status, spontaneous apoptosis and prognosis. Cancer Lett. 2004;208(2):215-25.

139. Sullu Y, Gun S, Atmaca S, Karagoz F, Kandemir B. Poor prognostic clinicopathologic features correlate with VEGF expression but not with PTEN expression in squamous cell carcinoma of the larynx. Diagn Pathol. 2010;5:35.

140. Kulapaditharom B, Boonkitticharoen V, Sritara C. Plasma vascular endothelial growth factor dysregulation in defining aggressiveness of head and neck squamous cell carcinoma. J Oncol. 2012;2012:687934.

141. Korampalli TS, Stafford ND. Expression of angiogenic growth factors in laryngeal carcinoma. Mol Clin Oncol. 2013;1(6):1013-8.

142. Schluter A, Weller P, Kanaan O, Nel I, Heusgen L, Hoing B, et al. CD31 and VEGF are prognostic biomarkers in early-stage, but not in late-stage, laryngeal squamous cell carcinoma. BMC cancer. 2018;18(1):272.

143. Bonhin RG, Rocha VB, Carvalho GM, Guimaraes AC, Crespo AN, Chone CT, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor expression and presence of lymph node metastasis in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;81(1):58-62.

144. Wang Z, Chen Y, Li X, Xu L, Ma W, Chang L, et al. Expression of VEGF-C/VEGFR-3 in human laryngeal squamous cell carcinomas and its significance for lymphatic metastasis. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2012;13(1):27-31.

145. Tong M, Lloyd B, Pei P, Mallery SR. Human head and neck squamous cell carcinoma cells are both targets and effectors for the angiogenic cytokine, VEGF. Journal of cellular biochemistry. 2008;105(5):1202-10.

146. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ. Potential autocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 2005;18(4):485-94.

147. Zhang SD, McCrudden CM, Meng C, Lin Y, Kwok HF. The significance of combining VEGFA, FLT1, and KDR expressions in colon cancer patient prognosis and predicting response to bevacizumab. Onco Targets Ther. 2015;8:835-43.

148. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. Cancer research. 1995;55(18):3964-8.

149. Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, Vesin A, Ezponda T, Zudaire I, et al. Expression of tumor-derived vascular endothelial growth factor and its receptors is associated with outcome in early squamous cell carcinoma of the lung. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2012;30(10):1129-36.

150. Omoto I, Matsumoto M, Okumura H, Uchikado Y, Setoyama T, Kita Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C and vascular endothelial growth factor receptor-3 in esophageal squamous cell carcinoma. Oncology letters. 2014;7(4):1027-32.

151. Lebok P, Huber J, Burandt EC, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, et al. Loss of membranous VEGFR1 expression is associated with an adverse phenotype and shortened survival in breast cancer. Mol Med Rep. 2016;14(2):1443-50.

152. Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Steiner GE, Rockwell P, Gedlicka C, et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. The Laryngoscope. 2001;111(10):1834-41.

153. Xu HM, Zhu JG, Gu L, Hu SQ, Wu H. VEGFR2 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cancer Cells Mediates Proliferation and Invasion. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP. 2016;17(4):2217-21.

154. Misawa Y, Misawa K, Kawasaki H, Imai A, Mochizuki D, Ishikawa R, et al. Evaluation of epigenetic inactivation of vascular endothelial growth factor receptors in head and neck squamous cell carcinoma. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2017;39(7):1010428317711657.

155. Zhao M, Hu X, Xu Y, Wu C, Chen J, Ren Y, et al. Targeting of EZH2 inhibits epithelialmesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma via regulating the STAT3/VEGFR2 axis. International journal of oncology. 2019;55(5):1165-75.

156. Brands RC, Knierim LM, De Donno F, Steinacker V, Hartmann S, Seher A, et al. Targeting VEGFR and FGFR in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. Oncol Rep. 2017;38(3):1877-85.

157. Pentheroudakis G, Nicolaou I, Kotoula V, Fountzilas E, Markou K, Eleftheraki AG, et al. Prognostic utility of angiogenesis and hypoxia effectors in patients with operable squamous cell cancer of the larynx. Oral oncology. 2012;48(8):709-16.

8.EKLER

8.1-Etik Kurul Onayı

"Larinks Kanseri'nde Anjiyogenez, Proliferasyon, Hücre Adezyonu ve İnvazyonla İlişkili Biyobelirteçlerin Araştırılması" Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu. Proje NO: GO 18/383, Karar NO: GO 18/383-11.

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557-830
Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi	: 15 MAYIS 2018 SALI
Toplantı No	: 2018/13
Proje No	: GO 18/383 (Değerlendirme Tarihi: 10.04.2018)
Karar No	: GO 18/383-11

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Gürcan GÜNAYDIN'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Nilda SÜSLÜ ile birlikte çalışacakları ve Dr. Ahmet Erim FAMUK'un yüksek lisans tezi olan, GO 18/383 kayıt numaralı, ***"Larinks Kanseri'nde Anjiyogenez, Proliferasyon, Hücre Adezyonu ve İnvazyonla İlişkili Biyobelirteçlerin Araştırılması"*** başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1.Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	10 Doç. Dr. Gözde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARI	(Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
4. Prof. Dr. Necdet SAĞINTAV	(Üye)	13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BÜYÜKOĞLU	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	
8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL İZİNLİ	(Üye)	17. Av. Meltem ONURLU İZİNLİ	(Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)		

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

8.2 Turnitin Raporu

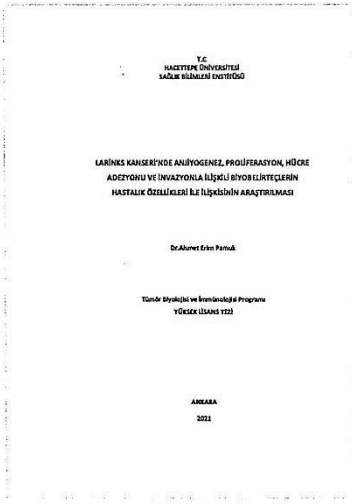
turnitin

Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	Ahmet Erim Pamuk
Assignment title:	Tez
Submission title:	Ahmet Erim PAMUK Yüksek Lisans ...
File name:	Ahmet_Erim_PAMUK_Y_ksek_Lisan..
File size:	793.41K
Page count:	64
Word count:	14,237
Character count:	93,764
Submission date:	05-Mar-2021 01:53PM (UTC+0300)
Submission ID:	1524916048



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LARİNKS KANSERİ'NDE ANJİYOGENEZ, PROLİFERASYON, HÜCRE ADEZYONU VE İNVAZYONLA İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN HASTALIK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr.Ahmet Erim Pamuk

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2021

Copyright 2021 Turnitin. All rights reserved.

Ahmet Erim PAMUK Yüksek Lisans Tezi (TEZ-5mart2021)

ORIGINALITY REPORT

15%	14%	5%	9%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Hacettepe University Student Paper	5%
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
4	KARAMAN, Ülkü, ATAMBAY, Metin, DALDAL, Nilgün and ÇOLAK, Cemil. "Kanser tanısı almış hastalarda Microsporidium görülme sıklığı", Türkiye Parazitoloji Derneği, 2008. Publication	1%
5	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Student Paper	1%
6	istanbulsaglik.gov.tr Internet Source	1%
7	hdl.handle.net Internet Source	1%
	www.kanservakfi.com	

8.3 Tez Çalışması Orjinallik Raporu

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ORİJİNALLİK RAPORU

5.03.2021

Hacettepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı:	AHMET ERİM	**Anabilim Dalı:**	Temel Onkoloji
Soyadı:	PAMUK	**Programı:**	Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
Numarası:	N17135621	**Danışmanı:**	Doç. Dr. Gürcan Günaydın
Statüsü:	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Doktora		

II. TEZ BİLGİLERİ

Önerilen Tez Başlığı:	LARİNKS KANSERİ'NDE ANJİYOGENEZ, PROLİFERASYON, HÜCRE ADEZYONU VE İNVAZYONLA İLİŞKİLİ BİYOBELİRTEÇLERİN HASTALIK ÖZELLİKLERİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

III. BEYAN

Yukarda başlığı / konusu gösterilen tez çalışmamın;
a) Kapak sayfası,
b) Giriş,
c) Ana bölümler,
d) Sonuç
bölümlerinden oluşan toplam 64 sayfalık kısmına ilişkin, **5.03.2021** tarihinde şahsım / tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından, aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 15 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:
1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç ~~/dahil~~
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Ad – Soyad
Ahmet Erim PAMUK

Ek 1: 1 adet; tezin tam başlığını, öğrencinin ad-soyad bilgisini ve dosyanın toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde, raporlama işlemi tamamlandıktan sonra alınacak ekran görüntüsü.
Ek 2: Dijital makbuz

IV. DANIŞMAN ONAYI:

UYGUNDUR
Ad – Soyad – İmza
Doç. Dr. Gürcan GÜNAYDIN

5.03.2021

Telefon: (312) 305 15 54 Fax: (312) 309 31 90 e-posta: sbe@hacettepe.edu.tr Detaylı Bilgi: http://www.saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr/