



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**BAŞ BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM
DOKULARINDA MİKROÇEVRE ELEMANLARI
EKSPRESYONLARININ HASTALIK
MEKANİZMASI ÜZERİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Saim PAMUK

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Murat ULUSAN

İSTANBUL

Mart 2021





T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIPFAKÜLTESİ

KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**BAŞ BOYUN SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM
DOKULARINDA MİKROÇEVRE ELEMANLARI
EKSPRESYONLARININ HASTALIK
MEKANİZMASI ÜZERİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Saim PAMUK

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Murat ULUSAN

İSTANBUL

Mart 2021

ETİK KURUL ONAY

Tarih ve Sayı: 07/12/2020-252060



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı**



Sayı :29624016-050.99- 1790
Konu :Doç. Dr. Murat ULUSAN hk.

Sayın Doç. Dr. Murat ULUSAN
Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Baş Boyun Cerrahisi

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dr. Saim PAMUK' un yürüteceği 2020/1778 dosya numaralı "Baş boyun suamöz hücreli karsinom dokularında tümör mikroçevre elemanları ekspresyonlarının hastalık mekanizması üzerindeki rolünün araştırılması" başlıklı çalışma, kurulumuzun 04/12/2020 tarih ve 30 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Ali Yağız ÜRESİN
Kurul Başkanı

Doğrulamak için:<http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEND1FTML>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Cihan KILIÇ Dahili : 31346

İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Çapa/Fatih/İSTANBUL
Tel : 0 212 414 21 38/414 20 00-31561 Faks : 0 212 414 21 38 / 635 11 93
e-posta : itf-dekanlik@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : <http://istanbultip.istanbul.edu.tr>



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanma sürecinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendirerek bu zorlu süreci kolay hale getiren, her zorlukta yardımına koşan, hiçbir fedakârlığı eksik etmeyen ve daima destek çıkarak tez danışmanlığımı üstlenen saygıdeğer hocam Doç. Dr. Murat Uluslan'a ve 2. tez danışman hocam İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Elif Sinem İplik'e minnet ve saygı ile teşekkür ederim.

Yorucu ve zorlu uzmanlık eğitimimi keyifli ve doyurucu hale getiren, beraber çalışmaktan onur duyduğum, sonsuz bilgi, görgü ve deneyimlerini benimle paylaşarak gelişimime sağladıkları katkılardan ötürü her zaman kendilerine minnet duyacağım, borçları asla ödenmeyecek olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. M. Nesil Keleş Türel'e, Prof. Dr. Ö. Erkan Kıyak'a, Prof. Dr. Kemal Değer'e, Prof. Dr. Yahya Güldiken'e, Prof. Dr. İsmet Aslan'a, Prof. Dr. Yusufhan Süoğlu'na, Prof. Dr. K. Serkan Orhan'a, Doç. Dr. Bora Başaran'a, Doç. Dr. Şenol Çomoğlu'na, Doç. Dr. Beldan Polat'a, Doç. Dr. Mehmet Çelik'e teşekkür ederim.

Bu süreçte bana hem abi şefkati hem usta-çırak ilişkisi ile yaklaşarak, tüm klinik ve cerrahi deneyimlerini hiç sakınmadan aktaran, hem iş hem özel hayatta beraber olmaktan sonsuz keyif aldığım Uzm. Dr. Levent Aydemir'e ve Uzm. Dr. Cömert Şen'e teşekkür ederim.

Asistanlık hayatımın belirli sürelerinde beraber olduğumuz, çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ve eğitimimde büyük katkıları olan Uzm. Dr. Hakan Avcı, Uzm. Dr. Erkan Öztürk, Uzm. Dr. Bayram Şahin, Uzm. Dr. Said Sönmez, Uzm. Dr. Meltem Bozacı Kılıçoğlu'na teşekkür ederim. Ayrıca keyif ve eğlence ile büyük uyum içinde çalıştığım, unutulmaz anılar biriktirdiğim, kendilerini çok sevdiğim ve sevgilerini yürekten hissettiğim, bundan sonrası için de zaman ve mekan dinlemeden kahkahalarımızın eksik olmayacağı sevgili kardeşlerim Dr. Hakan Kara, Dr. Seyfettin Aslan, Dr. Erdinç Uysal, Dr. Kağan Avcı, Dr. Utkucan Ayeser, Dr. Abdullah Çetin'e teşekkür ederim.

Bu süre içerisinde yolumun kesiştiği, gün içerisinde beraber çalıştığım, nöbetlerde sabahladığım, yaptıkları işe paha biçemediğim, her birini ailemden biri gibi sevdiğim, “isimsiz kahramanlar” olarak tanımladığım hemşire, personel, memur, sekreter, güvenlik görevlisi dahil tüm mesai arkadaşlarıma yürekten ve sonsuz teşekkür ederim.

Moleküler ve genetik testler, veriler ve analizler konusunda yardımları için İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'dan değerli hocam Sn. Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu'na, kendi yoğunlukları arasında bana da zaman ayıran Sn. Prof. Dr. Arzu Ergen'e, çalışmaya kendi çalışması gibi sahip çıkarak mesai harcayan M. Sc. Göksu Kaşarcı'ya ve M. Sc. Barış Ertuğrul'a katbekat teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde şüphesiz en büyük paya sahip olan canımdan çok sevdiğim aileme ayrıca paragraf açmak istiyorum. Beni her gördüğünde gözlerinin içi gülen, günün her saniyesi evlatlarını düşünerek geçiren annem Emine Pamuk’a, evlatları için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan koca yürekli babam Yaşar Pamuk’a, beni kendinden fazla önemseyerek bilmediğim eksiklerimi tamamlayan güzel ablam Gönül Pamuk’a canıgönülden teşekkür ediyorum. Karşıma çıkan tüm zorluklarda çekinmeden benimle beraber mücadele eden, bu yolda asla beni yalnız bırakmayan, hayatımın rengi, neşesi biricik eşim sevgili Gül Gizem Pamuk’a teşekkür ediyorum.

Son olarak rahmetle andığım ilkokul öğretmenim Nejat Doğruol nezdinde bugüne kadar eğitimime katkısı olan bütün öğretmenlerime şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37394

Dr. Saim PAMUK
İstanbul / Mart 2021

İÇİNDEKİLER

Etik Kurul Onayı.....	II
Önsöz	III
Şekil ve Grafik Dizini.....	VII
Tablo Dizini.....	VIII
Kısaltmalar	IX
Özet.....	1
Abstract	3
1. Giriş ve Amaç	5
2. Genel Bilgiler	5
2.1. Baş Boyun Kanserlerinin Sınıflandırılması.....	7
2.1.1. Oral Kavite Kanserleri.....	7
2.1.1.1. Onkolojik Anatomi ve Histoloji.....	7
2.1.1.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez.....	8
2.1.2. Orofarenks Kanserleri	9
2.1.2.1. Onkolojik Anatomi ve Histoloji.....	9
2.1.2.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez.....	10
2.1.3. Larenks Kanserleri	11
2.1.3.1. Onkolojik Anatomi ve Histoloji.....	11
2.1.3.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez.....	12
2.1.4. Hiofarenks Kanserleri.....	13
2.1.4.1. Onkolojik Anatomi ve Histoloji.....	13
2.1.4.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez.....	14
2.2. Baş Boyun Kanserlerinin TNM Evrelemesi	14
2.2.1. Oral Kavite Kanserleri T evresi.....	14
2.2.2. Orofarenks Kanserleri T evresi	15
2.2.3. Larenks Kanserleri T evresi	16
2.2.4. Hiofarenks Kanserleri T evresi.....	18
2.2.5. Rejyonel Lenf Nodları (N) Evresi	19
2.3. Baş ve Boyundaki Lenf Nodu Grupları	21
2.4. Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomu ve Tümör Mikroçevre Elemanları... 23	
2.4.1. Tümör ile ilişkili Makrofajlar (TAM).....	25
2.4.2. Düzenleyici / Regülatuar T Lenfositler (Treg).....	29
2.4.3. Tümör ile ilişkili Nötrofiller (TAN).....	30
2.4.4. Tümör ile ilişkili B Lenfositler (TAB).....	32
2.4.5. Dendritik Hücreler (DC).....	35
2.4.6. Programlanmış Hücre Ölüm Reseptörü ve Ligandı (PD-1/PD-L1)	36
3. Gereç ve Yöntem	39

3.1. Deney Grubu ve Seçilen Örneklerin Tanımı	39	
3.2. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Kitler	39	
3.3. Dokudan RNA İzolasyonu	40	
3.4. cDNA Sentezi	42	
3.5. Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Kantitatif Analizi	43	
3.6. İstatistiksel Analizler	46	
4. Bulgular	47	
5. Tartışma	55	
6. Sonuç	61	
Kaynakça	63	
Özgeçmiş	79	

Şekil ve Grafik Dizini

Şekil 1: Boyundaki cerrahi lenf nodu kompartmanları

Şekil 2: Tümör mikroçevresi çeşitleri

Şekil 3: Karsinogeneizde makrofaj polarizasyonu

Şekil 4: M2 makrofajlar ile mikroçevre elemanları arasındaki etkileşim

Şekil 5:Regülatuar T hücresinin mikroçevre elemanları üzerindeki rolü

Şekil 6: Nötrofil hücresinin karsinogenez sürecindeki rolü

Şekil 7: B lenfositler ile mikroçevre elemanları arasındaki ilişki

Şekil 8: Dendritik hücrenin mikroçevre elemanları üzerindeki etkileşimi

Şekil 9: Tümör hücresinin PD-1 / PD-L1 aracılığı ile mikroçevre hücreleri üzerindeki etkileşimi

Grafik 1: Erken ve ileri evre tümör gruplarında gen kat değişimlerinin karşılaştırılması

Grafik 2: Nod tutulumuna göre gen kat değişimlerinin karşılaştırılması

Grafik 3: Aile Hikayesinin varlığına göre gen kat değişimlerinin karşılaştırılması

Grafik 4: Sigara içme miktarına göre gen kat değişimlerinin gösterimi

Grafik 5: Tümör diferansiasyonuna göre gen kat değişimlerinin gösterilmesi

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Oral kavite tümörleri T evrelemesi

Tablo 2: HPV(+) orofarenks tümörleri T evrelemesi

Tablo 3: HPV(-) orofarenks tümörleri T evrelemesi

Tablo 4: Supraglottik larenks tümörleri T evrelemesi

Tablo 5: Glottik larenks tümörleri T evrelemesi

Tablo 6: Subglottik larenks tümörleri T evrelemesi

Tablo 7: Hipofarenks tümörleri T evrelemesi

Tablo 8: Baş boyun tümörleri klinik N evrelemesi

Tablo 9: Baş boyun tümörleri patolojik N evrelemesi

Tablo 10: Baş boyun tümörleri klinik TNM evrelemesi

Tablo 11: Baş boyundaki lenf nodu seviyeleri ve afferentleri

Tablo 12:cDNA PCR mixi içeriği (örnek başına)

Tablo 13:cDNA çevrimi için sıcaklık-süre protokolü

Tablo 14:qRT PCR için kullanılan primer dizileri ve Tm sıcaklıkları

Tablo 15:qRT-PCR reaksiyon protokolü

Tablo 16:Çalışma grubuna ait biyokimyasal parametreler

Tablo 17:Çalışma grubuna ait demografik parametreler

Tablo 18:Genlere ait kat değişim tablosu

Tablo 19:Perinöral invazyon, Perivasküler invazyon ve ENE varlığına göre gen anlatımlarının gösterilmesi

KISALTMALAR

BBSCC: Baş boyun skumaöz hücreli karsinomu

TME: Tümör mikroçevresi elemanları

TAM: Tümör ile ilişkili makrofaj

Treg:T regülatuar hücre

TAN:Tümör ile ilişkili nötrofil

TAB:Tümör ile ilişkil B lenfosit

DC:Dendritik hücre

PD-1:Programlanmış Hücre Ölüm Reseptörü

PD-L1:Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı

ENE: Ekstranodal yayılım

PNI: Perinöral yayılım

PVI: Perivasküler yayılım

HIF1 α : Hipoksiyle indüklenbilir faktör 1 α

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RT-PCR: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

DNA:Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

cDNA: Komplementer DNA

HPV: Human Papilloma Virüs

AJCC: Amerikan Kanser Komitesi

TNM: Tümör/ Lenf nodu/Metastaz

ÖZET

Baş Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom Dokularında Tümör Mikroçevre Elemanları Ekspresyonlarının Hastalık Mekanizması Üzerindeki Rolünün Araştırılması

Amaç: Baş boyun kanserleri, dünya genelindeki tüm kanser olguları incelendiğinde %4'lük dilimi oluşturarak, 6. sırada yer almaktadır. Baş boyun bölgesi anatomi ve fizyolojisinde yer alan kanser tipleri arasında ise skuamöz hücreli karsinom en sık görülen tümör çeşidi olarak karşımıza çıkmaktadır. Genişleyen literatür ve bilimdeki teknoloji imkanları ile son yıllarda kişiye ve tümöre özgü tedavi yöntemleri öne çıkmakta ve özellikle hastanın yaşam kalitesini primer düzeyde etkileyen, prevelansı, nüks oranı yüksek kanser türleri üzerine yapılan araştırmalar artmaktadır. Bu bağlamda, tümör mikroçevre elemanları hedef haline gelmiş ancak baş boyun kanserleri ile hastalık ilişkisinin henüz aydınlatılmadığı görülmüştür. Bu amaç doğrultusunda, çalışmamızda, baş boyun skuamöz hücreli karsinom (BBSCC) tümör ve tümör çevre dokularının mikroçevrede yer alan bazı bağışıklık sistemi hücre çeşitleri ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Kliniği'ne gelerek baş boyun skuamöz hücreli karsinom(BBSCC) tanısı almış ve opere edilmiş, hastaların tümör (n=47) dokuları ve tümör çevrelerindeki sağlıklı (n=47) dokularından alınan toplam 94 örnek kullanılmıştır. Tüm dokulardan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, cDNA sentezi yapılmış ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile mikroçevre elemanlarından; CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86, ITGAX gen ekspresyon seviyelerinin kantitatif analizi yapılmıştır.

Bulgular: Yapılan deneyler sonucunda tümör dokusunda CD274, FUT4, FOXP3 ve CD86 gen ekspresyonları sağlıklı dokuya göre anlamlı olarak artış gösterdiği görülmüştür. Lenf nodu tutulumları üzerinden gen seviyeleri incelendiğinde, lenf nodu tutulumu olan (%42,2) hastalarda FUT4 gen ekspresyon değişiminin istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır. Buna ek olarak, perivasküler invazyonu olmayan hasta grubunda (%48,9) CD163 gen ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı, ENE varlığına göre (%23,4) ise FUT4 gen ekspresyonunun istatistiksel düzeyde yükseldiği saptanmıştır. İleri tümör diferansiasyonuna sahip hastalarda (%4,4) ise ITGAX gen anlatımı az-orta derece diferansiasyon görülen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır.

Sonuç: Sağlıklı dokuya kıyasla tümör dokusunda artan gen ekspresyonları ve klinik

prezantasyonları ilişkisini gösteren çalışma bulgularımıza göre, bu genlerin BBSCC hastalık mekanizması ilişkilendirilebilecek klinik kullanım potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda tez çalışmamız, hasta örneklem sayısının arttırılarak ve ileri analizlerin eklenerek yapılabilecek olan yeni çalışmalar ile mikroçevre elemanlarının BBSCC de erken tanı, teşhis, tedavi ve tedavi takibinde yer alabilcek potansiyel biyobelirteçler arasında hedef olarak seçilebileceğini gösteren öncü niteliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Baş boyun skuamöz hücreli karsinom, tümör mikroçevre elemanları, CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86, ITGAX gen ekspresyonları.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:37394

ABSTRACT

Investigation of the Role of Tumor Microenvironment Elements Expression on the Disease Mechanism in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tissues

Objective: Head and neck cancers are in the 6th place, constituting 4% of all cancer cases worldwide. Squamous cell carcinoma is the most common type of tumor among the cancer types in head and neck anatomy and physiology. With the expanding literature and technological opportunities in science, individual and tumor-specific treatment methods have come to the fore in recent years, and research on cancer types with high prevalence and recurrence rate, which primarily affect the quality of life of the patient, is increasing. In this context, tumor microenvironment elements have become targets, but the relationship between head and neck cancers and disease has not been elucidated yet. For this purpose, we aimed to investigate the relationship between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tumor and tumor surrounding tissues with some immune system cell types in the microenvironment.

Material and Method: In our study, a total of 94 samples were taken from the tumor (n = 47) tissues of the patients (n = 47) and healthy (n = 47) tissues of the patients who came to the Istanbul University Istanbul Medical Faculty Otorhinolaryngology Clinic and were diagnosed with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and operated. used. RNA was isolated from all tissues, cDNA was synthesized and microenvironment elements were obtained by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method; Quantitative analysis of CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86, ITGAX gene expression levels was performed.

Results: As a result of the experiments, it was observed that CD274, FUT4, FOXP3 and CD86 gene expressions in tumor tissue increased significantly compared to healthy tissue. When gene levels were

examined through lymph node involvement, it was found that FUT4 gene expression change was statistically increased in patients with lymph node involvement (42.2%). In addition, it was found that CD163 gene expression increased significantly in the patient group without perivascular invasion (48.9%), while FUT4 gene expression increased statistically compared to the presence of ENE (23.4%). In patients with poorly tumor differentiation (4.4%), ITGAX gene expression was statistically significantly decreased compared to patients with well-to-moderate differentiation.

Conclusion: According to our study findings showing the relationship between increased gene expressions and clinical presentations in tumor tissue compared to healthy tissue, it is thought that these genes have clinical use potential that can be associated with the HNSCC disease mechanism. In this context, our thesis is a pioneer that demonstrates that microenvironment elements can be selected as a target among potential biomarkers that can be included in early diagnosis, diagnosis, treatment and treatment follow-up in the HNSCC, with new studies that can be carried out by increasing the number of patient samples and adding further analysis.

Key words: Head and neck squamous cell carcinoma, tumor microenvironment elements, CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86, ITGAX gene expressions.

This study was supported by the Scientific Research Projects Unit of Istanbul University. Project No: 37394

1.Giriş ve Amaç

Baş boyun kanserleri oral kavite, orofarenks, hipofarenks, larenks ve daha bir çok alt ünitelerden oluşan kapsamlı tanı ve tedavi gerektiren karmaşık bir hastalıktır. Her yıl 700.000 yeni vaka ile dünya genelindeki maligniteler arasında 6.sırada yer almaktadır (1, 2). En sık görülen baş boyun kanseri tipi % 90'ın üzerinde skuamöz hücreli karsinomdur (3). Sigara ve alkol kullanımı en önemli iki faktör olarak öne çıksa da, HPV enfeksiyonu ve betel nut çiğnemek baş boyun skuamöz hücreli karsinom gelişim riskini artırdığı bilinmektedir (4).

Son zamanlarda kanser mikrobiyolojisi üzerine tanı, tedavi ve önlenmesine yönelik birçok yenilik geliştirilmesine rağmen baş boyun kanserinin prognozu hala iyileştirilememiştir. Lokalize tümörlerde 5 yıllık hayatta kalma oranı %80, bölgesel ve uzak metastazda ise sırasıyla %60 ve %30 olarak kaydedilmektedir (6). Hastalığın lokasyon olarak kritik bölgede olması ve prognozun düşüklüğü göz önüne alındığında; tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren multidisipliner bir yaklaşım kaçınılmaz olmaktadır.

Kanser gelişimi hücre proliferasyonu ile apoptoz arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar ve çevresinde oluşturduğu kompleks sistem yardımı ile çevre dokuyu invaze edip uzak metastaz gerçekleştirirler. Bu kompleks sistem kanser oluşum aşamalarının tümünde görev alır ve tümör mikroçevresi olarak adlandırılır (6). Tümör mikroçevresi, kanser hücreleri ile immün sistem hücreleri arasındaki sinyalleşme yollarından oluşur. Bu yollar bazen protümöral bazen antitümöral sonuçlara neden olabilir (7, 8).

Tümör mikroçevresinin anlaşılması güç yapısı, kanser tedavilerinin zahmetli kemoradyoterapi modalitelerinden, bağışıklık sistemini regüle eden immünoteraplere ve aşılama yöntemlerine kaymasına neden olmuştur (9). Kanserli dokudaki bu mikroçevrenin içeriği, birbiri ile ilişkisi ve işlevlerini incelemek sağkalım başarısı için hedef haline gelmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda bazı kanser türleri ve mikroçevre elemanları, prognozla ilişkilendirilerek tanı ve tedavi aşamalarında klinik fayda için önemi vurgulanmış olmasına rağmen baş boyun bölgesi kanserleri için literatürün soru işaretlerine sahip olduğu görülmektedir (10, 11). Ekosistemin genişliği ve karmaşıklığı nedeniyle baş boyun kanserlerinde bağışıklık sistem hücrelerinin rolünü anlamak, kanser tanısı ve tedavisi için önemli ve detaylı bir konudur.

Kanser gelişimi yada önlenmesinde merkezi rolü olan tümör mikroçevre elemanları bağışıklık sistem hücreleri, tümör hücreleri ve onların ürünlerini içermektedir. Bu küme içerisinde başlıca tümör ile ilişkili makrofajlar, tümör ile ilişkili nötrofiller, T lenfositler

(regülatuar T hücreleri-Treg'ler), B lenfositler, tümör ile ilişkili fibroblastlar, dendritik hücreler ve NK hücreleri yer almaktadır(12, 13, 14).

Bu hücre gruplarının birbiri ile etkileşimi sonucu tümör progresyonu yada regresyonu mümkündür. Protümöral etki gösteriyorsa bunun hangi mekanizma ile birbiri üzerindeki hangi etki ile gerçekleştirdiği hala araştırmaya açık bir konudur. Hastalığın prognostik faktörlerinden olan lenf nodu metastazı, ektrakapsüler yayılım, tümör grade yada evresi üzerinde tümörmikroçevre hücrelerinin etkisi kaçınılmazdır.

Çalışmamız kapsamında baş boyun skuamöz hücreli karsinom hastalarının tümörlü dokusu ve sağlıklı dokularında kontrol grubu olarak alınan 94 örnek incelenmiştir. Bu incelemede sağlıklı doku ve tümörlü doku arasında mikroçevre elemanları için belirlediğimiz 6 aday genin (CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86 ve ITGAX) ekspresyon seviyelerini araştırmayı amaçladık Ekspresyon seviyelerinde oluşan farklıktan yola çıkarak bağışıklık sistem hücrelerinin birbiri ile ilişkisi ve hastaların prognostik faktörleri ile detaylı istatistik yapılmıştır. Daha geniş hasta grubunda ileri validasyonlar yapılarak biyobelirteç ve hedef immünoterapi olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiş ve olası belirteçlerin invaziv/noninvaziv yöntem geliştirilerek tanı/erken teşhiste kullanılabilirliği değerlendirilmiştir.

2. Genel Bilgiler

2.1.Baş Boyun Kanserlerinin Sınıflandırılması

2.1.1.Oral Kavite Kanserleri

2.1.1.1. Onkolojik Anatomi ve Histoloji

Oral kavite; önde üst ve al dudak cilt mukoza sınırı olan vermilyon hattından başlayarak, arkada dilin circumvallata papillaları, sert-yumuşak damak birleşimi ve anterior tonsiller plikaları tarafından oluşturulan orofarengeal isthmusa kadar uzanan bölgedir. Dudaklar, dilin 2/3 ön kısmı, ağız tabanı, retromalar trigon, üst ve alt alveoler ark, sert damak ve bukkal mukoza olmak üzere 7 alt bölüme ayrılan oral kavitenin tamamı çok katlı yassı epitel ile örtülüdür(15).

Dudaklar, anteriordan oral kaviteyi sınırlayarak majör kası orbicularis oris sayesinde adeta bir sfinkter görevi görür. Üst dudak lenfatik drenajı ipsilateral preauriküler, infraparotid, submandibuler ve submental bölgelere olmaktadır. Alt dudak lenfatikleri ise medialde submental, lateralde submandibüler nodlara boşalırken kontralateral yayılım görülebilir. Buradan üst ve orta derin juguler lenf nodlarına dökülür (16).

Alveolar ark; gingiva, maksilla ve mandibulanın processus alveolarisleri ve dişler tarafından meydana getirilerek oral kaviteyi vestibulum oris ve cavitas oris olarak iki bölüme ayırır. Lateralde bukkal mukoza, medialde sert damak ve ağız tabanı mukozası ile devam eder. Bukkal kısmı submandibuler ve submental bölgeye drene olurken, lingual kısmı üst juguler ve laterak farengeal nodlara drene olur (16, 17).

Dil, ters V şeklindeki sulcus terminalis aracılığı ile ikiye ayrılarak ön 2/3 lük kısmı corpus lingua adını alarak oral kaviteye dahil olurken, arka 1/3 lük arka kısmı radiks lingua adıyla orofarenks yapısına katılır. Yapısındaki intrinsek (m.transversus lingua, m.vertikalis lingua, m.longitudinalis superior ve m.longitudinalis inferior) ve ekstrinsek (m.hyoglossus, m.stiloglossus, m.genioglossus, m.palatoglossus) kaslar hareket ve şeklini belirlerken, yüzeyinde yer alan papillalar ise tat ve dokunma duyusunda görev alırlar. Submukozal pleksusta zengin bir lenfatik drenaj sahip olmasından ötürü dil ucu, dil kökü ve özellikle orta hatta uzanan lezyonlar bilateral yayılım göstermektedirler. Dil uç kısmı submental nodlara,

lateral kısmı submandibuler ve jugulodigastrik nodlara drene olur. Bazen direkt olarak alt derin juguler zincir tutulumu da olabileceği unutulmamalıdır (15, 17).

Retromolar trigon, tüberositas maksillaris ile alt 3.molar dişin distal yüzü arasındaki ramus mandibulayı örten gingiva bölümüdür. Alveolar ark ve retromolar bölge gingivası altındaki kemiğe sıkıca yapıştığından erken kemik invazyonu göstermektedirler. Lenfatik drenajı primer olarak üst derin servikal jugulodigastrik nodlara olmaktadır.

Ağız tabanı, mandibuler alveol ve corpus lingua arasına yerleşerek oral kaviteyi inferiordan hamak şeklinde sınırlayan, m.mylohyoideus ve m.hyoglossusun üzerini örten U şeklinde ince mukozal bir alandır. Lenfatik drenajı submukozal bir plexus oluşturarak ön kısmı bilateral submental ve submandibuler nodlara, arka kısmı ipsilateral üst derin juguler nodlara drene olur (16, 17).

Sert damak, maksillanın processus palatinusu ve palatin kemiğin horizontal parçasının birleşimiyle meydana gelerek oral kavitenin tavanını oluşturur. Bu bölgenin lenfatik drenajı üst derin juguler ve retrofarengeal nodlara olurken, nadiren submandibuler nodlar tutulabilir (17).

Bukkal mukoza, dudak mukozasının lateralde devamlılığı niteliğinde olup alveolar ark ve pterygomandibuler raphe arasında uzanır. Öndeki lezyonlar submental ve submandibuler lenf nodlarına, arkadaki lezyonlar üst derin juguler lenf nodlarına drene olurlar (15,17).

2.1.1.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez

Oral kavite kanserleri tüm dünya genelinde görülen malign neoplazmlar arasında en sık 6.tümör olarak karşımıza çıkar (18).Her yıl yaklaşık 400.000 yeni vakaya tanı konulduğu ve erkek baskınlığının olduğu kayıtlara girmiştir (19). Oral kavite kanserleri arasında en sık % 90'dan fazla oranda skuamöz hücreli karsinom görülürken, daha az sıklıkta minör tükürük bezi karsinomları, malign melanomlar, lenfomalar ve sarkomlar da gelişebilmektedir (20, 21).

Oral kavitedeki skuamöz hücreli kanserler iyi, orta, az diferansiyasyon göstermekle birlikte, daha agresif seyreden bazaloid hücreli ve düşük metastaz ihtimali olan iyi diferansiye verrüköz hücreli alt tipleri mevcuttur (22). Anatomik sınıflamada en sık dudak, 2.sıklıkta dil (lateral yüz orta kısmı), 3.sıklıkta ağız tabanında görülmektedir (23).

Oral kavite kanserlerinde birçok kanser türünde olduğu gibi tütün ve alkol en önemli etiyolojik faktör olarak rol almaktadır. Sigara ve alkolün sinerjistik etkileri oral kavite

karsinomu gelişme riskini 40 kata kadar artırabilmektedir (24). 20 yıldan fazla sigara kullanımı kanser gelişim riskini önemli derecede artırırken, sigara içmeyen bir kişi ile aynı riske sahip olabilmesi için 20 yıldır sigarayı bırakmış olması gerekmektedir (24, 25).

Bukkal mukoza kanserlerinde sigara içiciliğinden farklı olarak çiğneme şeklinde betel nut tüketimi Uzak Doğu ülkelerinde sık görülen diğer etiyolojik faktördür(26). Sert damak kanserlerinde ise tersten sigara içme alışkanlığına bağlı olarak risk artışı saptanmıştır (27). Alkol kullanımında en az 6 kat artmış risk bulunmakla birlikte özellikle ağız tabanı ve dil kanseri insidansı artmıştır (28).

Eritroplaki, lökoplaki ve liken planus gibi prekanseröz durumlarda da oral kavite karsinomu gelişme riski artmış olarak bulunmuştur (29). Ultraviole ışığına maruziyet özellikle dudak kanseri gelişimde etiyolojik olarak rol oynar (30). Oral kavite kanserleri için diğer etiyolojik faktörler arasında Plummer- Vinson sendromu, dental protezler, oral hijyenin kötü olması ve uzun süreli immün sistemin baskılanması sayılabilir.

2.1.2.Orofarenks Kanserleri

2.1.2.1.Onkolojik Anatomi ve Histoloji

Orofarenks; yumuşak damak ve hyoid kemikten çizilen horizontal düzlem arasında kalan, süperiorda nazofarenks, inferiorda hipofarenks ile devam eden, anteriorda oral kavite ile bağlantısı olan farenksin üç bölümünden bir tanesidir. Dilin ön 2/3 ve arka 1/3 sınırında ki circumvallata papillaları, sert-yumuşak damak birleşimi ve anterior tonsiller plikaları tarafından oluşturulan orofarengeal isthmus, oral kavite ile olan sınırını belirler. Posteriorsa 2. ve 3. servikal vertebraların korpusu ile komşuluk gösterir(15, 31).

Orofarenksin alt birimlerini dil kökü, yumuşak damak ve uvula, tonsiller bölge (tonsil plikaları, palatin tonsil ve tonsiller fossa) ve posterior farengeal duvar oluşturmaktadır (15, 17).

Dil kökü, sulkus terminalis ile vallekula da dahil olmak üzere epiglot başlangıcına kadar olan bölümdür. Tonsiller bölge, farenks yan duvarında ki tonsil plikaları ile sınırlanan tonsiller fossa ve palatin tonsilden meydana gelir. Tonsil plikaları anteriorda glossopalatin ve posteriorsa farengeopalatin kas ile üzerini örten mukozadan oluşmaktadır. Posterior farengeal duvar, bilateral farengeopalatin plikalar arasında kalan farenks arka duvarını içerir ve mukoza, submukoza, süperior konstrüktör kas ve tümör yayılımı için bariyer oluşturan bukkofarengeal fasyadan oluşur. Tüm orofarenks mukozası çok katlı yassı epitelle döşenmiş olmasına rağmen

yaygın lenfatik doku içermektedir (15, 17, 31).

Tümör yayılımı için potansiyel bir alan olan parafarengeal boşluk; medialde bukkofarengeal fasia ve tonsiller bölge, lateralde pterigoid kas ve mandibula ile komşu olarak kafatabanı ile hyoid kemik arasında uzanan bölgedir. IX, X, XI. kranial sinirleri, internal karotis arter ve internal juguler veni içermesinden ötürü bu bölgeye yayılan tümörler kolaylıkla kafa tabanını invaze edebilir (17).

Orofarenks kanserlerin yayılımı genellikle jugulodigastrik nodlara olmaktadır. Dil kökü ve posterolateral farengeal duvar lezyonları önce retrofarengeal ve parafarengeal, sonrasında jugulodigastrik ve posterior servikal lenf nodlarına drene olabilmektedir. Dil kökü, farenks posterior duvar ve yumuşak damak orta hat lezyonlarının bilateral yayılım yapabilmektedir (15, 32).

2.1.2.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenezi

Orofarenks kanseri diğer vücut bölgelerine göre nadir görülmekle birlikte Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 17.000, dünya genelinde ise yeni 140.000 vaka görülmektedir (33, 34). Oral kavite ve diğer farenks bölgeleriyle olan yakın komşuluğu tanı konulmasını zorlaştırmaktadır. Hastalık 5. ve 6. dekatlarda sık görülmekte ve erkek baskınlığı sergilemektedir(32).

Orofarenk kanseri için en bilinen risk faktörü beraber kullanıldığında sinerjistik etki gösteren sigara ve alkol tüketimi olmuştur (35). Son zamanlarda giderek yaygınlaşan diğer bir etiyolojik ajan HPV 16 başta olmak üzere HPV enfeksiyonudur (36). Özellikle daha genç, sağlıklı ve sigara içmeyen erkeklerde görülen orofarenks kanserleri %90 a varan oranda HPV ile ilişkilendirilmiştir (37). HPV ile ilişkili orofarenks kanserinin sıklığı zaman içinde %40 tan % 70 lere ulaşmıştır(38). Diğer suçlanan etiyolojik faktörler arasında yüksek doz radyasyon, kötü ağız hijyeni, immün yetmezlik ve beslenme bozuklukları sayılabilir.

Orofarenks tümörlerin %90 dan fazlasını HPV ile ilişkili yada ilişkisiz skuamöz hücreli karsinomlar oluşturmaktadır. Ayrıca lenfoid doku yaygınlığı sebebiye hematolenfoid tümörler, tükrük bezi tümörleri, malign melanom ve metastatik tümörler de görülebilmektedir (39). En sık tonsiller bölgeden kaynaklanan orofarenks tümörleri diğer baş boyun tümörlerine göre daha agresif seyretmektedir. Yumuşak damak yada tonsil plikasından gelişen kanserler daha iyi diferansiye iken dil kökü yada palatin tonsilden gelişen tümörler daha kötü diferansiyasyon göstermektedir. 5 yıllık sağ kalım HPV ile ilişkili tümörlerde %80 olmasına rağmen, HPV ile ilişkisiz tümörlerde %40 olarak raporlanmıştır (34).

2.1.3.Larenks Kanserleri

2.1.3.1.Onkolojik Anatomi ve Histoloji

Larenks, boyun orta hatta erişkinde 3-6, yeni doğanda 1-4.servikal vertrebralar seviyesinde dil kökü ile trakea arasında bulunan, öksürme, yutma, solunum, fonasyon ve hava yolunun korunması fonksiyonlarını yürüten önemli bir organdır (15).

Larenksin en üst ve öndeki komponenti kemik iskeletinin oluşmasını sağlayan U şekilli yapısı ile hyoid kemiktir. Kıkırdak iskeletini ise tek sayıdaki tiroid, krikoid ve epiglot; çift sayıdaki aritenoid, kornikulat ve küneiform kartilajlar oluşturmaktadır. Tiroid ve krikoid hyalin yapısında iken diğerleri fibroelastik kartilaj özelliği göstermektedir. Tiroid ve krikoid kartilajlar arasında krikotiroid eklem, krikoid ve aritenoid kartilajlar arasında krikoaritenoid eklem yer alır. Her ikisi de larenksin ön-arka kayma ve iç-dış rotasyon hareketlerinden sorumludur (31).

Çeşitli ligaman ve membranlar vasıtası ile larenks iskeletinin bir arada tutunması sağlanır. Tirohyoid membran, tiroid katilaj üst sınırlı ile hyoid kemik alt sınırında uzanarak, her iki yanda süperior larengeal damar ve sinirler tarafından delinmektedir. Krikotiroid membran, tiroid kartilaj alt sınırı ile krikoid kartilaj üst sınırı arasında anteriorda uzanır. Kuadranguler membran, epiglottisin lateral yüzünden başlayıp aritenoid kartilaja uzanarak süperiorda ariepiglottik foldu, inferiorda ise vestibular ligamanı ve yalancı vokal kordların oluşmasını sağlar. Triangular membran (konus elastikus,krikovokal membran), tiroid ve krikoid kıkırdaklar arasında larenksin alt kısmını sararak, arkada aritenoid kıkırdakların vokal çıkıntısına uzanır ve vokal ligamanları oluşturur(31).

Larenksin kasları ekstrensek ve intrensek olarak sınıflandırılır. Ekstrinsik kasları; larenksin depresyonundan sorumlu olan sternohyoid, tirohyoid ve omohyoid kaslar, elevasyonundan sorumlu olan geniohyoid, digastrik, mylohiyoid ve stilohyoid kaslardır. İntrinsik kasları; larenksin fonasyon ve hava yolu kontrolünde rol alarak vokal korda abduksüyon yaptıran posterior krikoaritenoid kas ve adduksüyon yaptıran lateral krikoaritenoid, tiroaritenoid, krikotiroid ve interaritenoid kaslardır(31).

Endolarenks larengeal girişiten(vestibulum larenks), krikoid kıkırdak alt kenarına kadar devam ederken vokal kordlar ile üç alt kompartmana ayrılır. Supraglottik bölge, epiglottisin üst ucu ile vokal kordlar arasındaki alanı tarifler ve epiglottis, aritenoidler, ariepiglottik plikalar, yalancı kordlar ve ventrikülleri içerir. Glottik bölge, gerçek vokal kordlar ve posterior

komissür arasındaki bölümdür. Subglottik bölge, vokal kord alt kenarından krikoid kartilaj alt sınırına kadar olan bölümdür (17).

Larenks yapısındaki potansiyel boşluklar tümör invazyonu ve yayılımı için önem arz etmektedir. Preepiglottik boşluk; epiglot anteriorunda yer alan, hyoepiglottik ligaman, tiroepiglottik ligaman, tirohyoid membran ve tiroid laminanın iç yüzeyi ile sınırlandırılmıştır. Paraglottik boşluk, lateralde tiroid kartilaj iç perikondriumu, inferomedialde konus elastikus, medialde ventrikül, süpreomedialde kuadrangular membran tarafından sınırlandırılmıştır. Paraglottik bölge tümörün transglottik ve ekstralarengeal yayılımlarında önemlidir. Üstte preepiglottik boşlukla ilişkilidir (15,17).

Endolarenks mukozasında epiglotun suprahoid kısmı, aryepiglottik plikaların üst kısmı ve vokal kordlar stratifiye yassı epitel ile kaplı iken, kalan kısımlar silialı kolumnar respiratuar epitel ile örtülmüştür (17,31).

Larenks lenfatikleri anatomik alt bölgelerine göre farklılık gösterir. Glottik bölgede vokal kordların lenfatik akımı çok zayıf ve ipsilateral olduğu için supraglottik ve subglottik kompartman arasında doğal bir bariyer oluşturur. Larengeal lenf akımının en yoğun olduğu supraglottik bölgenin drenajı tirohiyoid membranı geçerek üst ve orta derin juguler zincire olmaktadır. Epiglot orta hatta yer aldığından lenfatik akımı bilateralidir. Subglottik bölgenin drenajı çaprazlaşan yaygın kapiiler ağ nedeniyle üst grup lenfatikler prelarengeal noda (Delphian nodülü) ve oradan orta ve alt derin servikal zincire doğru olmaktadır. Alt grup lenfatikler ise paratrakeal ve trakeoözefageal nodlara drene olur (17,40).

2.1.3.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez

Larenks kanserleri tüm vücut malignitileri içinde %1, baş boyun kanserleri arasında ise %13'lük paya sahip olmakla birlikte erkeklerde kadınlara oranla 4 kat fazla görüldüğü bildirilmiştir (41, 42). Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde en sık 6.kanser türü olarak kayıtlara geçmiştir (42). Genellikle 5. dekattan sonra görülmekle beraber 7. ve 8. dekatlarda pik değerine ulaşmaktadır (42). Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre 5 yıllık survi yaklaşık %60, mortalitesi ise 100.000'de 3,6 olarak raporlanmıştır (43).

Larenks kanseri etiyojisinde birçok faktör olsa da sigara en önemli risk faktördür. Sigaranın türü, miktarı ve süresine bağlı olarak bu risk değişse de 30 kata kadar kanser görülme oranını artırmaktadır(44). Alkol tek başına etiyojide rol alsa da sigara ile birlikte tüketimi sinerjistik etki göstermektedir (45). HPV enfeksiyonunun da larenks kanserine neden olduğu bildirilmiş olup özellikle HPV 16 suçlanmaktadır(46). Ayrıca sebze ve meyveden fakir

beslenme, kömür tozu gibi çevresel ajanlara maruz kalma ve larengofarengeal reflü larenks kanseri gelişimi açısından suçlanan diğer faktörlerdir (47, 48).

Larenks kanserlerinin %90 dan fazlasını skuamöz hücreli kanserler oluşturmaktadır (31). Geri kalan ufak kısmında skuamöz hücreli larsinom varyantları, nöroendokrin maligniteler, tükürük bezi tümörleri, kondorsarkomlar, diğer sarkomlar, lenfomalar ve metastatik tümörler görülmektedir. Tüm bu maligniteler % 59 oranda glottik, % 40 supraglottik, % 1 ise subglottik bölgede tanı almaktadır (49).

2.1.4.Hipofarenks Kanserleri

2.1.4.1.Onkolojik Anatomi ve Histoloji

Hipofarenks; süperiorda orofarenks, inferiorda sevikal özefagus ile devam eden, anteriorda larenks, posteriorda retrofarengeal boşluk ile komşu olan farenks bölümüdür. Hyoid kemik ile krikoid kartilaj alt hizasından geçen horizontal düzlem arasında kalan hipofarenks, piriform sinüsler, postkrikoid bölge ve posterior faringeal duvar olmak üzere 3 alt bölüme ayrılır(17, 31, 40).

Piriform sinüs; lateralde tiroid kartilaj ve tirohyoid membran, medialde ariepiglottik plika ile komşu olan, apeksi krikoid kartilaj alt yüzüne uzanan ters şekilli bir piramidi andırır. Postkrikoid bölge, aritenoid ve krikoid kartilajların arka yüzünü oluşturarak piriform sinüs medial duvarı ile komşuluk gösterir. Posterior farengeal duvar, vallekula tabanı ile krikoaritenoid eklem arasında kalan farenksin posterior kısmını içerir(15, 31, 40).

Hipofarenks duvarı sırasıyla; üç alt bölgede devamlılık gösteren stratifiye skuamöz epitel, fibröz tabaka, middle ve inferior konstrüktör kas tabakası, en dışta ise bukkofarengeal fasya olmak üzere dört katmandan oluşur.

Hipofarenks yaygın submukozal bir lenfatik ağı sahiptir. Genellikle derin juguler sistemin üst ve orta nodları tutulmakla birlikte öncesinde çeşitli farklılıklar gösterebilir. Piriform sinüs lezyonları anteriorda krikotriod membran aracılığı ile paratrakeal ve peritrakeal lenf nodlarına drene olurken, posterior farengeal duvar retrofarengeal nodlara, postkrikoid bölge ise paratrakeal lenf nodlarına drene olur, ayrıca bilateralite söz konusudur (15, 17, 40).

2.1.4.2. Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Patogenez

Tüm baş boyun kanserlerinin yalnızca % 3-4 ü kadarını temsil eden hipofarenks

kanserleri oldukça nadir görülmekte ve ileri evrede tanı alabilmektedir(50). Yıllık insidansı 100.000 de 1 olan bu kanserler daha çok 6. ve 7. dekat gibi ileri yaş erkeklerde görülmektedir (17, 40).

Diğer baş boyun bölgelerinde kanser gelişimine neden olan sigara ve alkol, hipofarenks kanseri gelişimi için de bilinen en önemli etiyolojik ajanlar olarak dikkat çekerken, ayrıca tütün çiğneme ve odun dumanı maruziyeti de suçlanmaktadır(51, 52). Sigara içmeyen orta ileri yaş kadınlarda görülen ve demir eksikliği anemisi, disfaji, hipofarengeal web ve kilo kaybı ile karakterize Plummer-Vinson veya Paterson-Brown Kelly sendromu hipofarenks kanserleri ile ilişkilendirilmiştir(53). Beslenme yetersizliği, A vitamini eksikliği, larengofarengeal reflü, genetik predispozisyon ve HPV araştırılan diğer etiyolojik faktörlerdir.

Hipofarenks kanserleri arasında adenokarsinom, sarkom ve lenfoma görülebilmese rağmen, en sık histolojik tip % 95 oran ile skumaöz hücreli karsinomdur. Tümörün en sık kaynaklandığı hipofarenks bölgesi piriform sinüs iken, bunu posterior farengeal duvar ve postkrikoid bölge izlemektedir. Oldukça kötü bir prognoza sahip olan bu tümörlerde 5 yıllık sağkalım % 40 ın altındadır (17, 34).

2.2. Baş Boyun kanserlerinin TNM Evrelemesi

2.2.1 Oral Kavite Kanserleri T Evresi

T	Kriter
Kategorisi	
TX	Primeri tespit edilemeyen tümör
Tis	İn situ karsinom
T1	Tümör ≤ 2 cm, 5 mm den az derin invazyon(DOI)
T2	Tümör ≤ 2 cm, DOI > 5 mm ve ≤ 10 mm veya tümör > 2 cm ve ≤ 4 cm, DOI ≤ 10 mm
T3	Tümör > 2 cm ve ≤ 4 cm, DOI > 10 mm veya tümör > 4 cm ve DOI ≤ 10 mm
T4	Orta, ileri ve çok ileri lokal hastalık
T4a	Orta, ileri lokal hastalık: Tümör > 4 cm ve DOI > 10 mm veya (dudak) Tümör kortikal kemiği invaze etmekte veya inferior alveoler sinir, ağız tabanı, yüz cildi tutulmuş; (oral kavite) tümör sadece bitişik yapılara invaze (mandibula ve maksilla kortikal kemik tutulumu, maksiller sinüs veya yüz cildine uzanım), diş socketinden girerek kemik invazyonu yapan gingiva tümörleri T4

	grubuna girmez
T4b	Çok ileri lokal hastalık; tümör mastikatör boşluk, pterygoid plateler, kafa tabanını tutmuş ve/veya internal karotis arter invazyonu var ise

Tablo 1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, oral kavite tümörleri
Tevrelemesi (54)

2.2.2.OrofarenksKanserleri T Evresi

HPV(+) T evresi

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha küçük
T2	Tümörün en büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 4'cm den küçük
T3	Tümörün en büyük boyutu 4 cm'den büyük veya epiglottisin lingual yüzüne uzanım göstermesi
T4	Orta düzeyde lokal ileri hastalık; tümör larenks, ekstrinsek dil kaslarına, medila pterygoid, sert damak veya mandibulaya ve/veya ötesine invaze

Tablo 2: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, HPV(+) orofarenks tümörleri T evrelemesi (54)

HPV(-) T evresi

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümörün en büyük boyutu 2 cm veya daha küçük
T2	Tümörün en büyük boyutu 2 cm'den büyük ancak 4'cm den küçük
T3	Tümörün en büyük boyutu 4 cm'den büyük veya epiglottisin lingual yüzüne uzanım göstermesi

T4	
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık; Tümör larenks, ekstrensek dil kaslarına, medila pterygoid, sert damak veya mandibulaya invaze
T4b	Çok İleri düzeyde lokal ileri hastalık; Tümör lateral pterygoid kas, pterygoid düzlem, lateral nazofarenks veya kafa tabanına invaze veya karotis arterini sarmış durumda

Tablo 3: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, HPV(-) orofarenks tümörleri T evrelemesi (54)

2.2.3.LarenksKanserleri T Evresi

Supraglottik Bölge

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör supraglottisin bir alt bölgesine sınırlıdır, vokal kord hareketleri normaldir.
T2	Tümör supraglottisin birden fazla alt bölgesinin mukozasını veya glottisi veya supraglottis dışındaki bir bölgeyi (örneğin dil kökü mukozası, vallekula, piriform sinüs medial duvarı mukozası vb.) tutmuştur, kord hareketleri normaldir.
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya post- krikoid bölge, preepiglottik dokular, paraglottik alan invazedir ve/veya tiroid kıkırdak iç korteksi invazedir.
T4	
T4a	Tümör tiroid kıkırdağın dış korteksini invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Tablo 4: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, supraglottik larenks tümörleri T evrelemesi (54)

Glottik Bölge

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör vokal kordlara sınırlıdır ve kord hareketleri normaldir (anterior veya posterior komissür invazyonu olabilir).
T1a	Tümör tek bir vokal korddadır.
T1b	Her iki vokal korda da tümör mevcuttur.
T2	Tümör supraglottis ve/veya subglottise uzanmakta ve/veya kord hareketleri kısıtlanmaktadır.
T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır veya tiroid kartilajın iç korteksine invazyon vardır.
T4	
T4a	Tümör tiroid kıkırdağın dış korteksini invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrinsik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Tablo 5: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, glottik larenks tümörleri T evrelemesi (54)

Subglottik Bölge

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Tümör subglottise sınırlıdır.
T2	Tümör vokal kordlara uzanmakla birlikte kord hareketleri normal veya kısıtlanmıştır.

T3	Tümör larenks içinde sınırlı olmakla birlikte kord fiksasyonu vardır ve/veya paraglottik alan invazyonu vardır veya tiroid kartilajın iç korteksine invazyon vardır.
T4	
T4a	Tümör krikoid ya da tiroid kıkırdağı invaze etmiştir ve/veya larenks dışı dokulara taşmıştır (örneğin trakea, dilin derin ekstrasik kasları, prelarengeal kaslar, tiroid veya özefagus gibi boyun yumuşak dokuları).
T4b	Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.

Tablo 6: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, subglottik larenks tümörleri T evrelemesi (54)

2.2.4.HipofarenksKanserleri T Evresi

T Kategorisi	Koşul
Tx	Tümör değerlendirilemedi.
Tis	Karsinoma in situ
T1	Hipofarenks tek bir alt bölümünde sınırlı ve/veya ≤ 2 cm küçük tümör
T2	Birden fazla hipofarenks alt bölümüne veya komşu bölgeye invaze, veya 2 cm den büyük fakat 4 cm geçmeyen, fiksasyon oluşturmeyen tümör
T3	4 cm den büyük yada hemilarenks fiksasyonu oluşturan yada özefagial mukoza yayılan tümör
T4	
T4a	Orta düzeyde lokal ileri hastalık; Tümör krikoid ya da tiroid kıkırdağı , hyoid kemiği, tiroid glandı, özefagial mukozayı yada santral kompartmanı* invaze etmiştir
T4b	Çok İleri düzeyde lokal ileri hastalık; Tümör prevertebral alanı invaze etmiştir, karotid arteri çevrelemiştir veya mediastinal yapıları invaze etmiştir.
	*Not:Prelarengeal strap kaslar ve subkutanöz yağ içeren yumuşak doku

Tablo 7: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, hipofarenks

tümörleri T evrelemesi (54)

2.2.5. Rejyonel Lenf Nodları (N) Evresi

Klinik N (cN)

N Kategorisi	Koşul
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.
N1	En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N2	
N2a	En büyük çapı 3cm üzerinde ancak 6 cm.yi geçmeyen, tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N2b	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır ve ENE(-)*
N2c	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontrlateral lenf nodlarında metastaz vardır ve ENE(-)*
N3	
N3a	En büyük çapı 6cm.nin üzerinde olan bir lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N3b	Klinik olarak aşikar ENE(+)* herhangi bir lenf nodu mevcuttur.

Tablo 8: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, baş boyun tümörleri klinik N evrelemesi (54)

Patolojik N (pN)

N Kategorisi	Koşul
Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilememektedir.
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yoktur.
N1	En büyük çapı 3 cm'yi geçmeyen tek bir ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N2	

N2a	En büyük çapı 3cm.yi geçmeyen, tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve <u>ENE(+)*</u> veya aynı tarafta en büyük boyutu > 3 cm ancak ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı ve ekstrakapsüler yayılım (-)
N2b	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen multipl ipsilateral lenf nodlarında metastaz vardır ve ENE(-)*
N2c	Hiçbirinin çapı 6 cm'yi geçmeyen bilateral veya kontrlateral lenf nodlarında metastaz vardır ve ENE(-)*
N3	
N3a	En büyük çapı 6cm.nin üzerinde olan bir lenf nodunda metastaz vardır ve ENE(-)*
N3b	En büyük çapı 3cm.yi geçen, tek ipsilateral lenf nodunda metastaz vardır ve <u>ENE(+)*</u> veya multipl ipsilateral, kontralateral yada bilateral lenf nodunda metastaz vardır ve <u>ENE(+)*</u> veya tek taraflı kontrallateral herhangi boyutta lenf nodunda metastaz vardır ve <u>ENE(+)*</u>

*ENE: ektranodal yayılım.

Tablo 9: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, baş boyun tümörleri patolojik N evrelemesi (54)

Evreleme:

T	N	M	Evre
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1, T2, T3	N1	M0	III
T4a	N0, N1	M0	IVA
T1, T2, T3, T4a	N2	M0	IVA
Herhangi bir T	N3	M0	IVB
T4b	Herhangi bir N	M0	IVB
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	IVC

Tablo 10: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, baş boyun tümörleri klinik TNM evrelemesi (54)

2.3.Baş ve Boyundaki Lenf Nodu Grupları

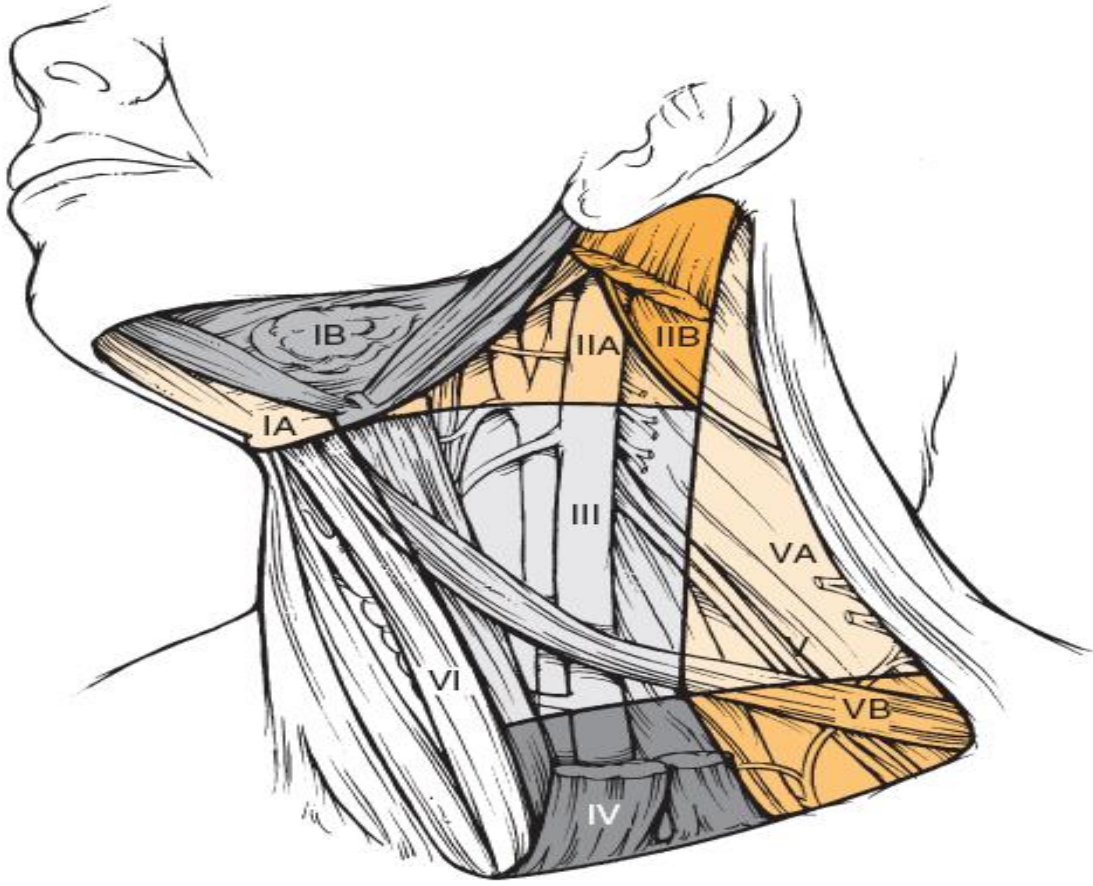
Baş boyun bölgesinde tüm vücudun %30 u olan yaklaşık 300 lenf nodu içerecek kadar zengin lenfatik sistem mevcuttur. Lenf nodları, lenfatik sıvıyı filtre ederek adeta bir bariyer gibi vücut savunmasında primer rol almaktadır. Lenf nodlarını, baş ve boyun bölgesinde ayrı ayrı incelemek daha doğru olacaktır (3).

Seviye	Lenf Nodu	Afferent Drenajı
Ia	Submental	Mentum, alt dudak ortası, dil ön kısmı, ağız tabanı, anterior alveoller ark
Ib	Submandibuler	Burun, yanak, anterior nazal kavite, üst dudak, alt dudak laterali, oral kavite, submandibuler bez ve seviye Ia
IIa	Derin üst juguler zincir	Aurikula, angulus mandibula, oronazal kavite, nazofarenks, orofarenks, hipofarenks, larenks, parotis, suboksipital, retrofarengeal ve seviye Ib
IIb	Derin üst juguler zincir	Aurikula, angulus mandibula, oronazal kavite, nazofarenks, orofarenks, hipofarenks, larenks, parotis, suboksipital, retrofarengeal ve seviye Ib
III	Derin orta juguler zincir	Oral kavite, nazofarenks, orofarenks, hipofarenks, larenks, seviye Ia, Ib, IIa ve IIb
IV	Derin alt juguler zincir	Hipofarenks, larenks, tiroid, servikal özefagus, paratrakeal ve seviye III
Va	Spinal aksesuar zincir	Nazofarenks, orofarenks, posterior kafa ve boyun cildi, suboksipital ve retrofarengeal nodlar
Vb	Supraklavikuler nodlar	Seviye II, III, aksiller nodlar
VI	Anterior juguler ve juxtavisceral	Tiroid bezi, glottik ve subglottik larenks, piriform apeks, servikal özefagus, hipofarenks, trakea, anterior boyun

Tablo 11:Baş boyundaki lenf nodu seviyeleri ve afferentleri

Baş Bölgesi	Boyun Bölgesi
➤ Parotid • Ekstraglandüler ✓ Preauriküler ✓ İnfraauriküler • İntraglandüler	➤ Submental
	➤ Submandibuler • Preglandüler • Postglandüler • Prevasküler • Postvasküler • İntrakapsüler
➤ Postauriküler	➤ Sublingual
➤ Suboksipital	➤ Anterior servikal • Anterior juguler zincir • Juxtavisceral zincir ✓ Prelaringeal (Delphian) ✓ Pretiroid ✓ Pretrakeal ✓ Paratrakeal
➤ Buksinatör(Fasiyal)	
➤ Derin fasiyal	➤ Süperfisial servikal
	➤ Derin servikal • Retrofarengeal • Spinal aksesuar zincir • Transvers servikal zincir • İnternal juguler zincir

Tablo 12: Baş boyundaki lenf nodu grupları



Şekil 1: Boyundaki cerrahi lenf nodu kompartmanları (34 no'lu kaynaktan alınmıştır.)

2.4.Baş ve Boyun Skumaöz Hücreli Karsinomu ve Tümör Mikroçevre Elemanları

Dudaklar, oral kavite, nazal vestibül, orofarenks, hipofarenks, larenks ve daha bir çok alt üniteden oluşan baş boyun bölgesini kanserleri her yıl dünya genelinde yaklaşık 700.000'e yakın yeni vaka ve 400.000 kanser nedeni ölüme neden olmaktadır (5). Mevcut rakamsal verilere göre tüm maligniteler arasında insidans olarak 6. ve mortalite olarak 8.sırada yer almaktadır (56).Vakaların %95'i üst aerodigestif sistemden kaynaklanmakta ve skuamöz hücreli karsinom olarak raporlanmaktadır (57).Başlıca etiyolojik faktörlerden olan sigara ve alkol tüketimi, HPV enfeksiyonu ve areka cevizi (betel nut) çiğnemenin baş boyun skuamöz hücreli karsinom (BBSCC) gelişme riskini artırdığı bildirilmiştir (58). Hastalığın moleküler biyolojisi, tanı, tedavi ve önlenmesine karşı geliştirilen bunca yeniliğe rağmen prognoz hala iyileştirilememiştir. 5 yıllık sağkalım lokalize tümörlerde %80'in üzerinde iken, bölgesel ve uzak yayılımı sırasıyla %60 ve %30'lara kadar düşmektedir (59). Hem lokasyon hem de

prognoz göz önüne alındığında hastalığın tedavisi cerrahi, radyoterapi ve kemoterapiyi içeren multidisipliner bir yaklaşımı gerektirmektedir.

Kanser hücreleri içinde bulunduğu kompleks ortam sayesinde sürekli büyüyerek çevre dokuyu invaze eder ve lokal ve uzak metastazlar gerçekleştirirler. Tümör mikroçevresi olarak adlandırılan bu karmaşık ekosistem, karsinogenez sürecinin tüm aşamalarında aktif bir rol üstlenmektedir (6). Kanser hücresi, immün sistem hücreleri ve stromal hücreler arasındaki otokrin ve parakrin haberleşme ağı ile kurulan tümör mikroçevresi; immünsüpresyon yolu ile protümöral yanıt yada immünstimülan yol ile antitümöral yanıt oluşturabilecek benzersiz bir özelliğe sahiptir (7,60)

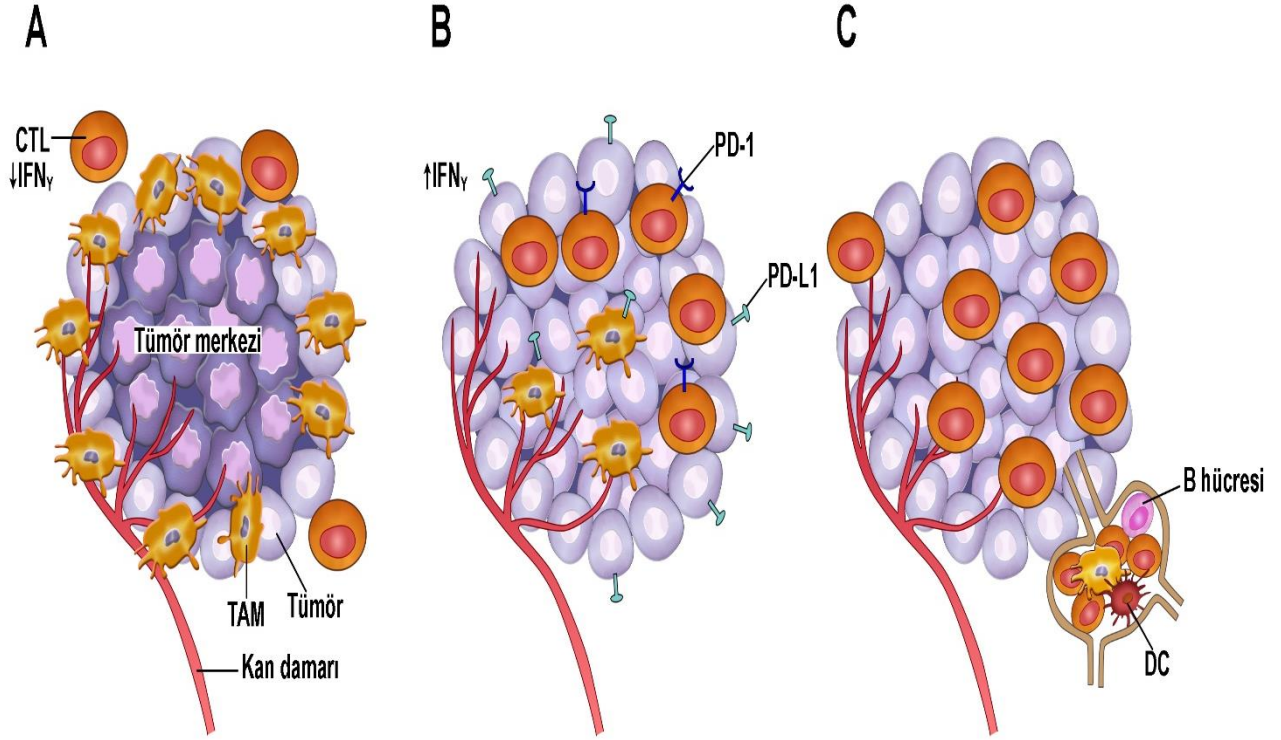
Tümör mikroçevresinin karmaşık yapısı; tümör tedavilerinin geniş çaplı ve yüklü kemoradyoterapi yöntemlerinden, immün sistemi düzenleyen hücre bazlı antikor immünoterapilerine ve kanser aşılamalarına doğru yönelmesine sebep olmuştur (9).Tümör mikroçevre elemanlarının (TME) çeşitliliği, miktarı ve işlevlerini araştırmak, bu yenilikçi tedavi modalitelerinin başarısı için son yıllarda trend haline gelmiştir (9).Yapılan birçok çalışmada bazı baş boyun kanseri mikroortam hücreleri alt tiplerinin prognozla olan ilişkisi gösterilmiş, klinikopatolojik sonuçlarla ilişkilendirilerek tedavi stratejilerine dikkat çekilmiştir (61, 62). Buna rağmen konunun genişliği ve karmaşıklığı nedeniyle BBSCC’de immün sistem hücrelerinin rolünü anlamak, kanser tanısı ve tedavisi için önemli bir potansiyeldir.

BBSCC tümör gelişimi yada baskılanmasında kilit rol alan TME’nin heterojen çeşitliliği içinde immün sistem hücreleri, sitokinler, tümör hücreleri ve ekstraselüler matriksten oluşan stroma yer almaktadır (7). TME bağışıklık sistemi hücrelerini ise tümör ile ilişkili makrofajlar, tümör ile ilişkili nötrofiller, T lenfositler (CD8 + T hücreleri, CD4 + T hücreleri, foliküler yardımcı T hücreleri ve regülatuar T hücreleri-Treg'ler), B lenfositler, tümör ile ilişkili fibroblastlar, dentritik hücreler, NK hücreleri oluşturur (63, 64, 65).

İnsan ve hayvan deneylerine dayanarak yapılan araştırmalarda intratümöral / peritümöral hücre ve sitokin yoğunluğuna göre genel olarak üç çeşit tümör mikroçevresi tanımlanmıştır.İnfiltrate–noninflame (A)mikroçevre olarak isimlendirilen sınıfta; tümör merkezi inflamatuvar hücrelerden yoksun iken, çevre sınırı boyunca sitotoksik T lenfosit ve tümör ile ilişkili makrofajlar ile kuşatılmıştır (9). Tümör çekirdeğinin hücreden fakir olması nedeniyle immün sistem patojene karşı kör kabul edilip zayıf immünojenik yada “soğuk” tümör olarak nitelendirilmiştir (66, 67). İmmünolojik olarak “sıcak” kabul edilen yüksek yeterliliğe sahip infiltrate–inflame (B) mikroçevre sınıfında ise tümör çekirdeği PD-1 eksprese eden sitotoksik T lenfosit ve PD-1 ligandını eksprese eden makrofajlar ile infiltredir, dolayısıyla oldukça aktif bir immüniteye sahiptir (9).Tersiyer lenfoid yapılar(C) olarak adlandırılan diğer alt sınıfta ise

B lenfosit, regülatuar T lenfosit, dentritik hücre ve makrofaj içeren lenf noduna benzer yapılar tümöre bitişik sınırdaki konumlanmıştır (9, 68).

Şekil 2: Tümör mikroçevresi çeşitleri



A-İnfiltrasyon-noninflamatuar /B-İnfiltrasyon&inflamatuar/C-Tersiyer lenfoid yapı

2.4.1. Tümör ile İlişkili Makrofajlar (TAM)

Doğal immünite elemanı olan makrofajlar, kemik iliğinden üretilerek dolaşıma salınan monositlerin dokuya yerleşmiş olan bir myeloid hücre formasyonudur (69). Makrofajlar, hem tümör merkezi ve hem de peritümoral stromada en bol bulunan hücre tipi olarak tümör mikroçevresi elemanlarının amiral gemisi konumunda yer almaktadır (70, 71). Plastisiteleri sayesinde sitokin ve kemokinler aracılığı ile hem protümör hem de antitümör fonksiyon gösteren makrofajlar, doğal ve adaptif immün sistem arasında adeta köprü vazifesi görmektedir (72).

Karsinogenez gelişimi sırasında birçok alt gruba ayrılan makrofajlar; genel olarak M1,

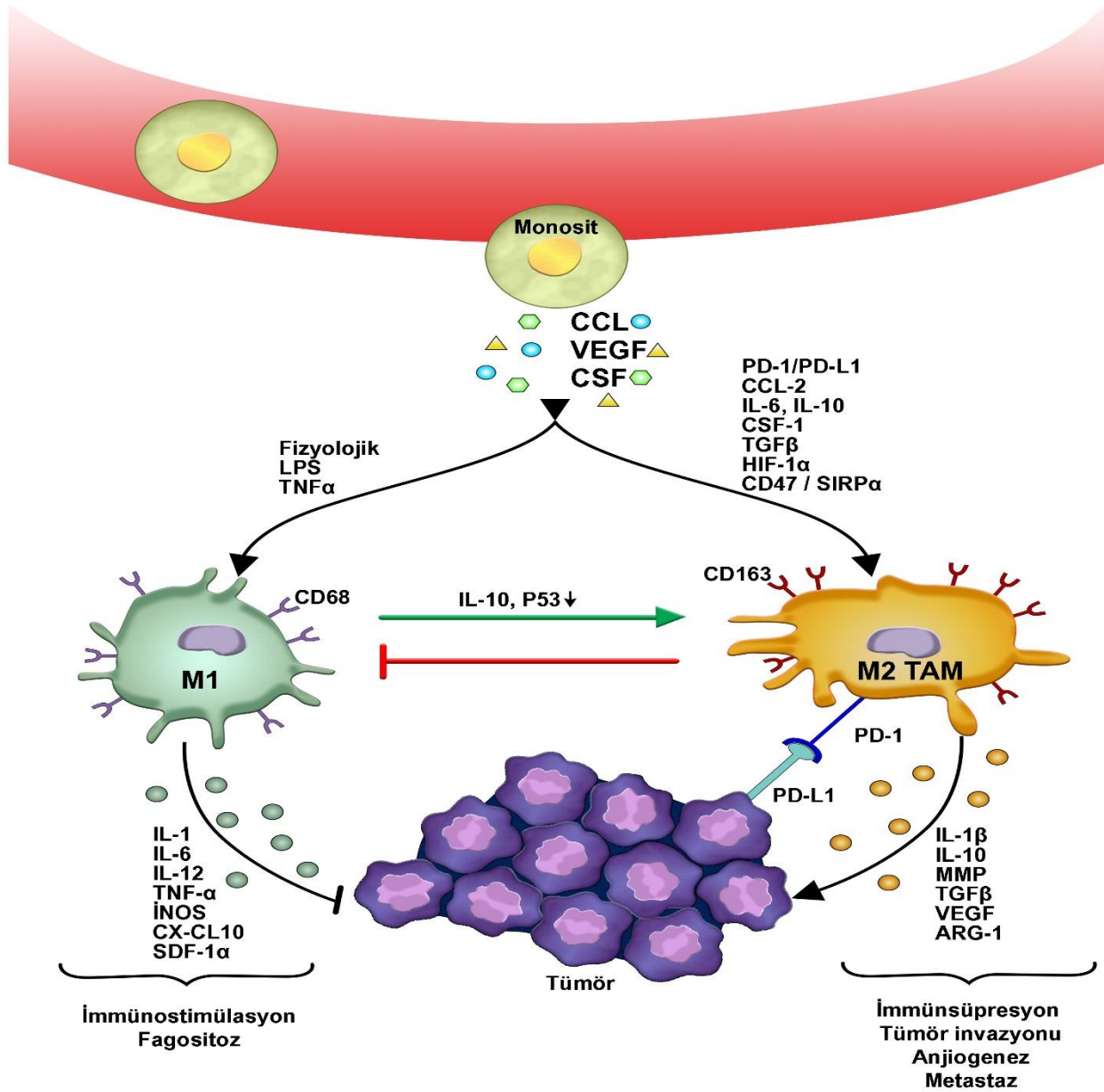
M2 ve M0 olarak sınıflandırılırlar. Klasik olarak aktive edilen M1 ve alternatif olarak aktive edilen M2 hücreleri polarizasyon gösterirken, M0 hücreleri polarizasyon göstermemektedir (73). M1 makrofajlar; immün sistemi uyararak proinflamatuvar, tümör hücrelerinin öldürülmesine katkıda bulunarak antitümöral özellik gösterir ve klasik yolla aktive edilmiş makrofajlar olarak adlandırılır (74, 75). M2 makrofajlar; immün sistemi baskılayarak immünsüpresif ve antiinflamatuvar, tümör hücrelerinin progresyonuna yardımcı olarak protümöral özellik gösterir ve alternatif yolla aktive edilmiş makrofajlar olarak adlandırılır (76). M0 makrofajlar ise inaktif durumdaki nonpolarize hücreler olup, mikroçevre sinyallerine göre M1 yada M2 hücrelerine dönüşebilir (73). Tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM), tümör içerisindeki ve çevresindeki makrofajlardan ibaret olup esas olarak M2 makrofajlar tarafından temsil etmektedir (77). Pankreas, meme, over, akciğer ve baş boyun maligniteleri gibi bir çok solid tümörde TAM infiltrasyonu tanımlanmış ve prognozla ilişkilendirilmiştir (78, 79).

Dolaşımdaki inflamatuvar monositler, tümör mikro ortamından salınan CCL, VEGF, CSF gibi kemokinler sayesinde ekstrasvazasyon yaparak makrofajların olay yerinde baskın hücre olmasını sağlarlar (80). Fizyolojik durumlarda yada bakteriyel LPS ve TNF- α indüklemesiyle M1 polarizasyonu gerçekleşir (81). M1 makrofajlar ise interlökin (IL) 1-6-12, TNF- α , iNOS, CXCL-10, SDF1 α gibi yüksek proinflamatuvar sitokinler salgılayarak immünstimülasyona neden olur. (81, 82) Dolayısı ile M1 makrofajlar fagositosizi artırarak antitümöral özellik sergiler. Diğer taraftan tümör mikro çevresindeki CCL-2, IL6-10, CSF-1, TGF- β ve hipoksiyle indüklenebilir faktör 1 α (HIF1 α) gibi sitokinler ve PD-1 / PD-L1, CD47 / SIRPa gibi reseptör ligand etkileşimleri sayesinde makrofaj polarizasyonu M2 yönünde olmaktadır (76, 81, 83). M2 hücreler bu farklılaşma ile TAM'ları oluşturur ve IL-1 β , IL-10, MMP, TGF- β , VEGF, ARG1 gibi anti inflamatuvar sitokinler salgılayarak immünsüpresif bir ortamda bir yandan protümöral aktivite gösterirken diğer yanda M1 makrofajları inhibe eder (84).

TAM'ların tespiti için birçok immünohistokimyasal belirleyici kullanılmış olup bunlar arasında en yaygını CD 68 ve CD 163'tür (85). CD 68 monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller ve bazofiller tarafından eksprese edilirken, M1-M2 makrofaj fenotip ayırımı yapamamaktadır (86). CD 163 reseptörü ise M2 makrofajları tarafından yüksek oranda eksprese edilerek TAM için spresifik bir belirteç konumuna gelmiştir (85).

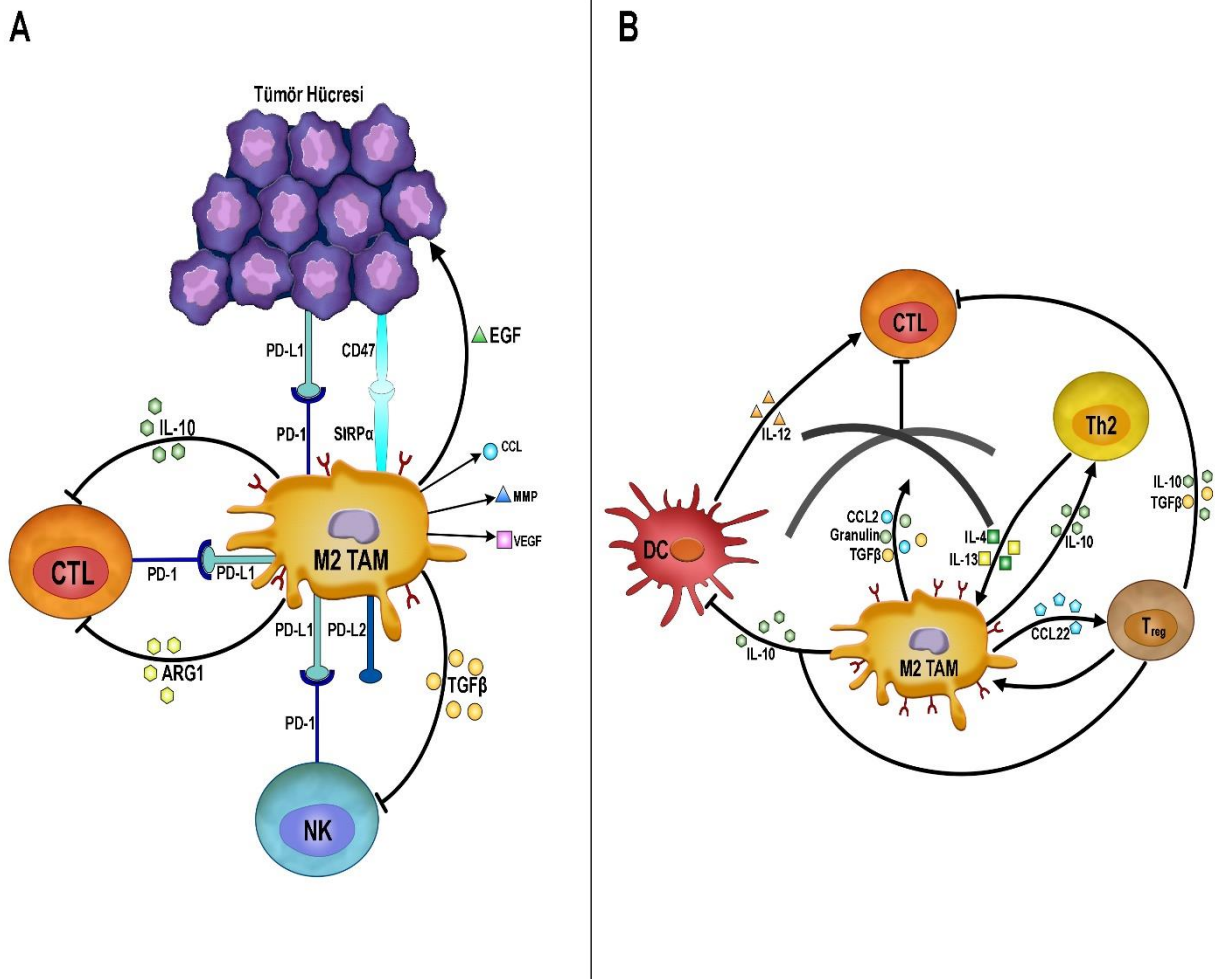
Tümör mikro çevresinde TAM baskınlığı VEGF, TGF- β ve MMP gibi sitokinlerin artışına, böylece kanserli hücrelerin invazyonu, anjiogenezi ve metastazına destek olmaktadır (76). Tümörlü hücreler ile TAM arasındaki PD-1 / PD-L1, CD47 / SIRPa gibi reseptör ligand sinyalleşmesi makrofaj fagositoz disfonksiyonuna yol açarak tümör büyümesine neden olur

(87).Aktive edilmiş M2 makrofajlar IL-10 sayesinde Th2 aracılı immün yanıtı artırırken, Th2 lenfositler de IL4-13 ile M2 polarizasyonu indükler (73). M2 makrofajlar ile Treg lenfositler arasında da çift yönlü bir etkileşim mevcuttur. Treg'ler M2 makrofaj farklılaşmasını sağlarken, M2 makrofajlar da CCL-2 sekresyonu ile Treg'lerin mikro ortamda çoğalmasını sağlamaktadır (88).



Şekil 3: Karsinogenezde makrofaj polarizasyonu

TAM'lar antitümör ortamını sağlamak için negatif etki ile CD8+ sitotoksik T lenfosit tümör mikro ortamına alınmasını, NK hücrelerinin ve B hücrelerinin işlev görmesini engellemektedir (73, 74, 89). TAM tarafından eksprese edilen programlanmış hücre ölüm proteini 1 ligandı (PD-L1) sayesinde sitotoksik T lenfosit ve NK hücre apoptozunun gerçekleştiği düşünülmektedir (90, 91). Makrofajlar tarafından salgılanan granülin tümör etrafında fibröz bir tabaka oluşturularak T lenfositlerin mikro ortamda birikmesi engellenmektedir (92). Ayrıca TAM'ların arginaz 1 sekresyonu yolu ile T lenfosit çoğalmasını baskıladığı, TGF- β sekresyonu ile NK hücre sitotoksitesini engellediği görülmüştür (76). TAM'lar, tümör ile ilişkili dendritik hücrelerin IL-12 sekresyonunu engelleyerek dolaylı yoldan T hücre üzerinde negatif etki etmektedir (93). Tüm bu mekanizmalardan ötürü tümör hücresi immün sistemden kaçarak progresyonunu sürdürmektedir.



Şekil 4: M2 makrofajlar ile mikroçevre elemanları arasındaki etkileşim

2.4.2. Düzenleyici / Regülatuar T Lenfositler (Treg)

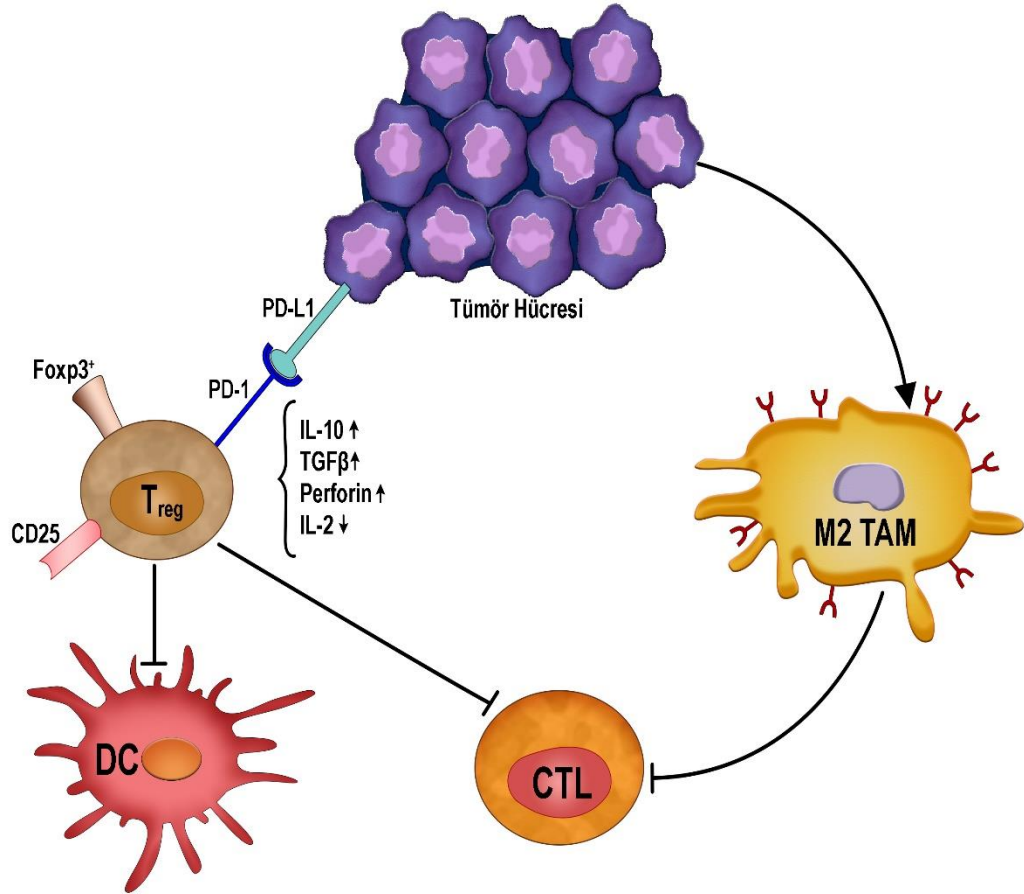
Virüs ile enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini öldürmek, antikor üretimine katkı sağlamak, gecikmiş aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol almak gibi immün yanıtın merkezinde rol alan T lenfositler, timustaki olgunlaşma süreci ve artı-eksi seçimini tamamladıktan sonra yüzeyindeki CD glikoprotein çeşidine bağlı olarak farklılaşırlar (94). CD4+ lenfositler, yardımcı lenfositler (Th) olarak adlandırılır ve vücutta ki T lenfositlerin % 65'ini oluşturur. Th1 alt grubu, IL-2 sekrete ederek CD8+ T lenfositlerin efektör/etkinleşmiş sitotoksik T lenfositlere dönüşmesine; Th2 alt grubu IL-4 ve IL-5 salgısı ile B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretmesine yardım ederler. CD4+ lenfositler, antijen sunan hücrelerdeki (APC) HLA-II kompleksi ile aktive olur (95). CD8+ lenfositler, sitotoksik lenfositler olarak adlandırılır ve virüsle enfekte hücreleri, tümör ve allograft hücreleri perforin salgısı ve apoptoz aracılığı ile öldürür (94). CD8+ sitotoksik lenfositler, tümör hücre yüzeyindeki HLA-I kompleksi ile aktif hale getirilir (96).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar salgıladıkları süpresör sitokinlerle antitümör immün bağışıklığı inhibitörü olarak çalışan, CD4+ lenfositlerin bir alt kümesi olan düzenleyici / regülatuar T hücrelerini (Treg) tanımlamışlardır (97, 98). Tümör mikroçevresinde immünsüpresyona katkı sağlayan Treg'ler, yüzeyinde CD4 + liğinin yanı sıra, CD25 glikoproteini ve FOXP3 transkripsiyon faktörünü eksprese eder(99). Tümörlere karşı immüntoleransın sürdürülmesini sağlayan Treg'ler, tümör bağışıklığı ile sınırlı kalmayıp organ transplantasyonu ve gebelik dahil olmak üzere immünregülasyonun tüm aşamalarında görev alırlar (100,101).

Şimdiye kadar üç tip Treg tanımlanmıştır: nTreg, iTreg ve Th3 (102). Doğal Treg (nTreg) CD4+CD25+FOXP3+ olarak tanınır ve dolaşımdaki yardımcı T lenfositlerin %5-10'unu temsil eder. Bakir T lenfositlerden indüklenerek oluşan indüklenmiş Treg (iTreg) ve Th3 ise FOXP3- olmasına rağmen IL-10 ve TGF- β gibi süpresör sitokinler salgılamaktadır (102). Bunlara rağmen Treg gelişimi, farklılaşması ve olgunlaşmasını kontrol etmek için FOXP3 ekspresyon ürününün gerekliliği gösterilmiştir (103).

Treg'ler, yüzeylerindeki CTLA-4 proteini ile sitotoksik (effektör) T lenfositler ile temas kurar. Sonrasında salgıladıkları inhibitör sitokinler IL-10, TGF- β ve lizis yapıcı perforin sayesinde efektör T lenfositlerin ve APC'lerin aktivitelerini bozar (7, 104). CD4+CD25+FOXP3+ Treg ler, IL-2 üretimini azaltarak bakir T lenfositleri etkiler ve totalde

T lenfosit proliferasyonunu engeller (105).Ayrıca PD-L1 üreten tümör hücreleri, hem Treg üzerindeki PD-1 reseptörü ile doğrudan bağlantı kurarak hem de makrofajlar aracılığı ile sitotoksik lenfositleri etkisiz hale getirip antitümör immüniteden kaçabilmektedir (106).



Şekil 5: Regülatuar T hücresinin mikroçevre elemanları üzerindeki rolü

Treg'lerin birçok kanser türünde olduğu gibi BBSCC'lerinde de sağlıklı dokulara göre arttığı ve bunun düşük CD8+ sitotoksik hücre sayısı ile orantılı olduğu görülmüştür.Ayrıca FOXP3+ Treg yüksekliğinin tümör evresini pozitif prognozu ise negatif etkilediği kanıtlanmıştır(107, 108,109).

2.4.3. Tümör ile İlişkili Nötrofiller (TAN)

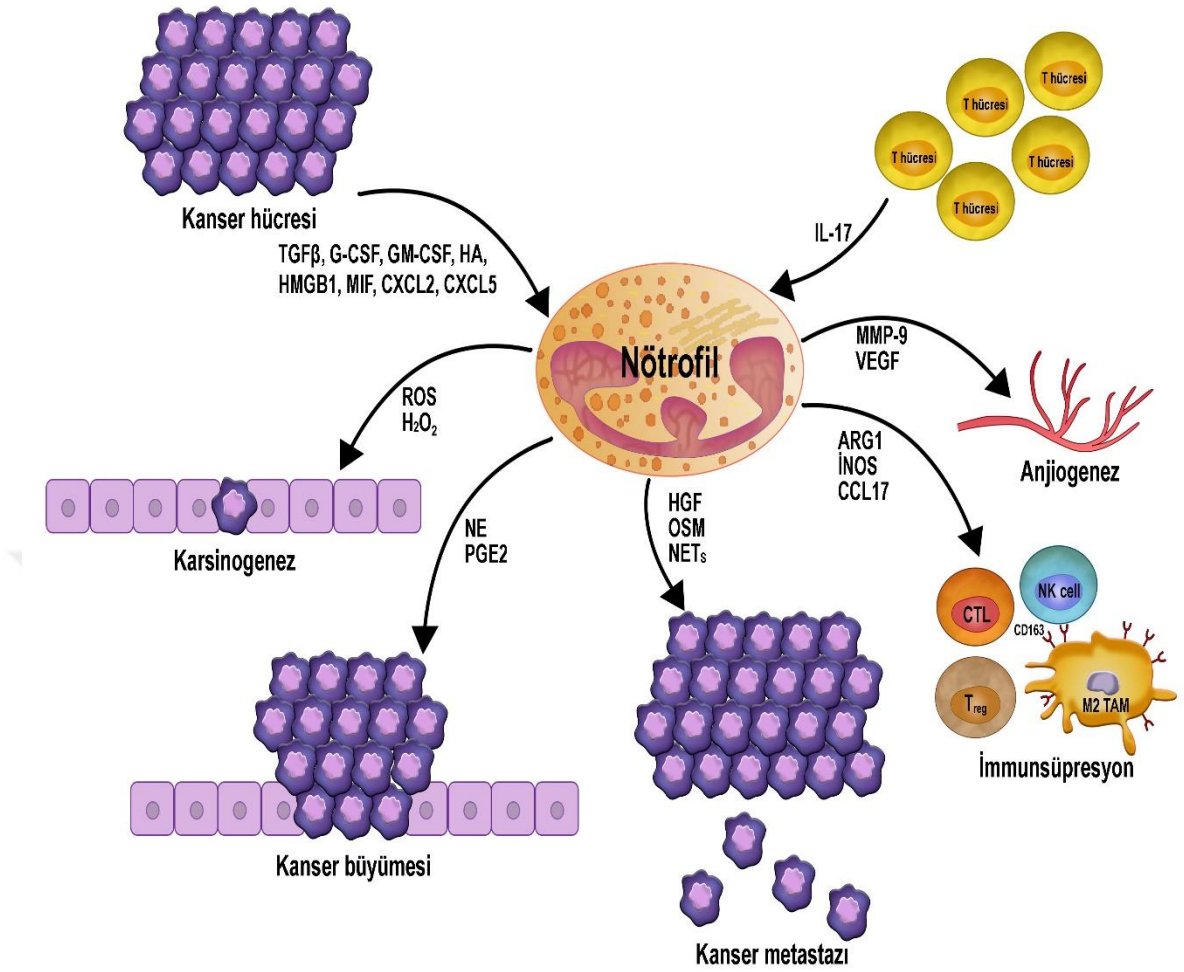
Nötrofiller, enflamasyon bölgesine hareket ederek fagositer özellikleri ile patojenleri yok eden savunma hattının ilk sırasındaki doğal immünite hücreleridir (110).Dolaşımdaki lökositlerin %70 ini oluşturan nötrofiller, kanser dahil bir çok immünolojik olayda rol olarak

tümör mikroçevresinin önemli bir bileşeni olmuştur (111). Nötrofilleri iki yüzü keskin bir bıçağa benzetirsek; mikrobisidik etki ile olumlu, yıkıcı enzimleri sonucu doku yıkımı ile olumsuz özellik gösterir.

Tümör ile ilişkili nötrofiller (TAN), tıpkı TAM'lar gibi yüksek plastisite gösterdiklerinden, antitümöral-immünstimülan özellikli N1 ve protümöral-immünsüpresan özellikli N2 alt gruba ayrılırlar (112, 113) Antitümör özellikli nötrofiller (N1 TAN); hem reaktif oksijen türleri (ROS), miyeloperoksidaz (MPO), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve proteazlar üreterek doğrudan, hem de Fc reseptörleri sayesinde antikör aracılı sitotoksik aktivite gösterir (113). Ayrıca nötrofiller; T hücre proliferasyonu ve sitokin üretimini destekleyerek, NK hücrelerinin sitotoksitesini artırarak, dentritik hücrelerin olgunlaşmasını sağlayarak ek antitümöral özellikler gösterir (114, 115).

Protümöral aktivite gösteren nötrofiller (N2 TAN), ürettikleri ROS aracılığı ile telomer DNA hasarı vererek karsinogenez sürecini başlatabilirler (116). Diğer taraftan nötrofil elastaz (NE) ve COX-2 aracılı prostaglandin E₂ (PGE₂) sentezi yoluyla etrafındaki neoplastik hücreler ile etkileşime girerek tümör büyümesini teşvik ederler (117). Nötrofiller, onkostatin M (OSM), G-CSF ve hyaluronan (HA) gibi mediatörler ve T hücresi kaynaklı IL-17 sayesinde metastaza yardımcı olurlar (118, 119). Ayrıca ana kaynağı nötrofiller olan MMP-9 ve VEGF, tümör angiogenezini düzenleyerek tümöral aktiviteyi sürdürür (112). Tümör tarafından uyarılan nötrofiller, arginaz 1 (ARG1) ve PD-L1/PD-1 aracılığı ile T hücre proliferasyonunu, CD8+ T lenfosit sitotoksitesini ve NK sitotoksitesini engellerken, CCL17 salgısı ile Treg ve makrofajları düzenleyerek aktive eder. Böylelikle antitümöral immünite baskılanır (120, 121).

Tümör mikroçevresinden salınan IL8, IL-17, CXCL-5, TLR-4, LTB₄, HIF-1 α , HMGB-1 gibi kemotaktik moleküller nötrofillerin tümör hücrelerine doğru göç etmesine neden olurken, IFN- β ve TGF- β zıt yönde etki gösterir (113). Tümörögenез sürecinin erken aşamasında nötrofiller, tümör hücrelerine karşı daha sitotoksik iken, ilerleyen süreçte bu işlevler azalır ve bu hücreler daha protumoriyenik bir fenotip kazanır (113). Birçok tümör türünde gösterildiği gibi BBSCC'lerinde de tümör ortamında nötrofil infiltrasyonu gösterilmiştir (122). Yüksek nötrofil oranı ileri tümör evresi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenden ötürü antitümör tedavisinde nötrofillerin hedef alınması ve N1 fenotipine yönlendirilmesi önem kazanmaktadır.



Şekil 6: Nötrofil hücresininkarsinogenez sürecindeki rolü

2.4.4. Tümör ile İlişkili B lenfositler (TAB)

Vücüttaki immünolojik olaylara yanıt verme yeteneği esas olarak lenfoid seri hücrelerin görevidir. Lenfoid seri hücreler 3:1 oranında T ve B lenfositlerden oluşmaktadır. B lenfositleri, kök hücrelerinden farklılaştıktan sonra T lenfositten farklı olarak timüs yerine kemik iliğine yönlenir ve olgunlaşmasını tamamlar (94). B hücreleri, antijen sunma yeteneklerine ek olarak, özellikle Th-2 hücrelerinden salınan IL4 ve IL-5 yardımı ile antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşır. Bu farklılaşmada T hücre yüzeyindeki CD28 ve CD40L, B hücre yüzeyindeki B7 ve CD40 ile etkileşime girmelidir (94). Lenf düğümlerinin germinal merkezlerinde ve dalağın ak pulpasında yerleşmişlerdir.

Tümör mikroçevresinde bulunan hücrelerden bir diğeri tümör ile ilişkili B lenfositler

ve plazma hücreleridir. Diğer mikroçevre elemanlarına göre daha az sayıda olsalarda sitokin ve antikor üretebilirler (123).Tümör ile ilişkili B hücreleri, tümör etrafındaki tersiyer lenfoid yapılarda (TLS) immün agregatlar oluşturarak ürettikleri antikor ve fenotipe bağlı olarak protümöral yada antitümöral etki gösterebilir (124).

TAB ve plazma hücreleri tarafından IgG1 tipi antikor üretimi, antikora bağlı sitotoksisiteyi ve dolayısı ile fagositozu kolaylaştırarak antitümöral etki gösterir. B lenfositler; CD4+ ve CD8+ T lenfositlere kendileri aracısız tümör antijeni sunarak yada ürettikleri antikorlar sonucu TAM ve dendritik hücreler yoluyla antijen sunumu yaparak immünstimulan görev yapar. Ek olarak TAB'ler, IFN- γ ve IL-12 gibi sitotoksik sitokinler yada granzim B gibi litik enzimler kullanarak tümör hücrelerine saldırabilir (124).

Diğer taraftan protümöral özellikli TAB; IL-10, IL-35 ve TGF- β üreterek immünsüpresif karakterdeki myeloid hücre polarizasyonunu ve Treg oluşumunu destekler, ayrıca PD-L1 aracılığı ile efektör T lenfosit fonksiyonlarını bozar. TAB tarafından aktiflenen Treg, B lenfosit plazmosite çevirerek immünsüpresif kistata katılır. B lenfositleri, antijen tepkimesine girmeyen ve dolayısı ile antijen sunumu işlevine yaramayan nonfonksiyone antikorlar üretebilir. Bunun sonucunda antikora bağlı sitotoksisite ve tümör hücre fagozitozu gerçekleşmemiş olur. Oluşan bu işlevsiz antikorlar immünkompleksler şeklinde birikerek kronik inflamasyonu tetikler ve inefektif bir antitümör immün yanıt oluşturur (124).

Tümör mikroçevresinde TAB varlığı, akciğer, mide ya kolorektal kanser gibi patolojilerde iyi prognozla ilişkilendirilmişse de,BBSCC kanserlerinde prognoza etkisi belirlenememiştir (125, 126).

2.4.5. Dendritik Hücreler (DC)

Dendritik hücreler, makrofaj ve B hücreleri gibi görevi CD4+ T hücrelerine antijen sunmak olan MHC II sınıf hücrelerden bir diğeridir. Dendritik denmesinin sebebi, yabancı antijenlerle etkili temas kurabilmek için nöronal dendritlere benzer şekilde çok uzun ve dar uzantılara sahip olmasıdır (94). Esas olarak deri ve mukozada altında yerleşik olan bu hücreler, periferde lenf düğümlerine göç ederek vücuda giren yabancı antijeni ya direkt T hücrelerine sunar ya da B hücrelerinin antikor üretme kapasitesini artırarak antijene karşı immünite oluşturur (94).

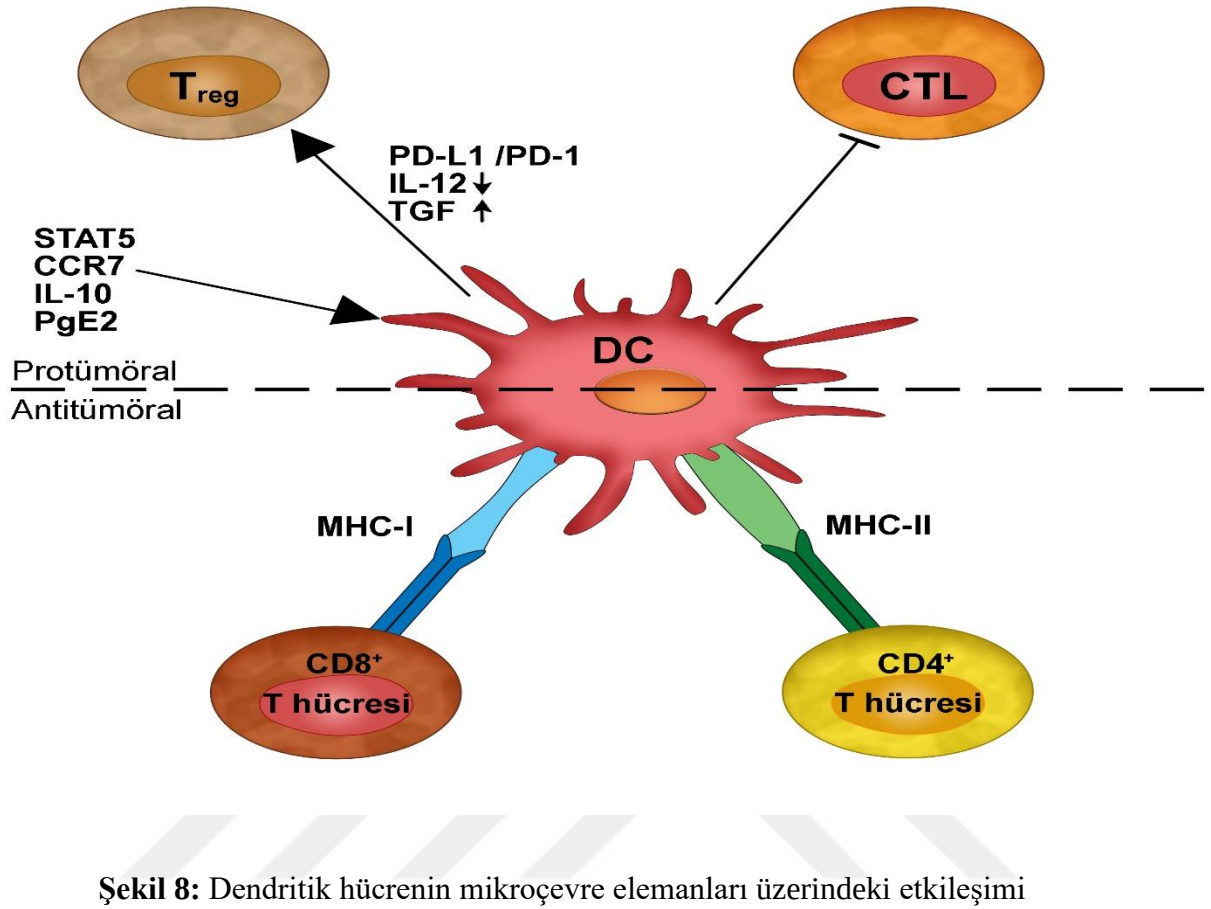
Dendritik hücreler genel olarak iki popülasyonda incelenir: Klasik DC'ler (cDC) ve plazmasitoid DC'ler (pDC) (127). cDC'ler kendi arasında tip 1 ve tip 2 diye ikiye ayrılarak antijen sunumundan esas görevli hücre iken, pDC'ler interferon gibi sitokin salınımdan sorumludur. cDC'ler genelde CD11c ile ifade edilirken, pDC'ler CD123 yüzey ekspresyonu sergiler. Tümör mikro çevresindeki DC'ler immün sistemi aktive edebilir ya da immün toleransın sürdürülmesine yardımcı olabilir.

Özellikle tip 1 cDC'ler hücre içi patojenleri, virüsleri ve tümör hücrelerini, tip 2 cDC'ler ise flagellin ya da lipopolisakkarit gibi bakteri, mantar ve parazitleri yapılarını tespit ederek TLR'ler vasıtasıyla IL-12 ve INF gibi proinflatuar sitokinler üretir (127, 128) Bunun sonucunda CD4+ T lenfositler ve NK hücreler aktive olarak immünstimulan yolak işler. cDC'ler MHC II aracılığı ile CD4+ T hücrelere antijen sunarken, çapraz bağlı ile eksojen antijenlere karşı MHC I aracılı CD8+ T lenfositleri de uyarak tümör mikroçevresinde antitümör yanıtı artırır (129, 130, 131).

Diğer taraftan STAT5, CCR7, IL-10, prostoglandin E2 başta olmak üzere çeşitli STAT, sitokin ve kemokinler aracılığı ile cDC'leri indüklenerek Treg hücrelerinin çoğalmasına ve CD4+ T hücrelerin negatif seçilimine neden olabilirler(127, 131, 132). cDC'ler bu indüklenme sonucunda IL-12 salgısını azaltıp, TGF üretimini artırarak, Treg polarizasyonunu teşvik eder. Ayrıca CD8+ sitotoksik T lenfosit oluşumu da bastırılmış olur.(133). PD-L1/ PD-1 etkileşimi bu Treg düzenlenmesi ve efektör T hücre inhibitörüne yardımcı olan diğer faktördür (134). Dolayısı ile antitümör yanıt zayıflatılarak immünsüpresif bir ortam oluşturulmuş olur.

Birçok malignitede DC varlığı daha önceki çalışmalarda tartışılmış olup, BBSCC'lerde sayılarının önemli ölçüde azaldığını ve işlevlerinin bozulduğunu belirten yayınlar mevcuttur. CD11c+ DC'lerdeki bu azalmanın kusurlu antitümör yanıtından sorumlu

tutulabileceği belirtilmiştir (135, 136).



Şekil 8: Dendritik hücrenin mikroçevre elemanları üzerindeki etkileşimi

2.4.6. Programlanmış Hücre Ölüm Reseptörü ve Ligandı (PD-1 / PD-L1)

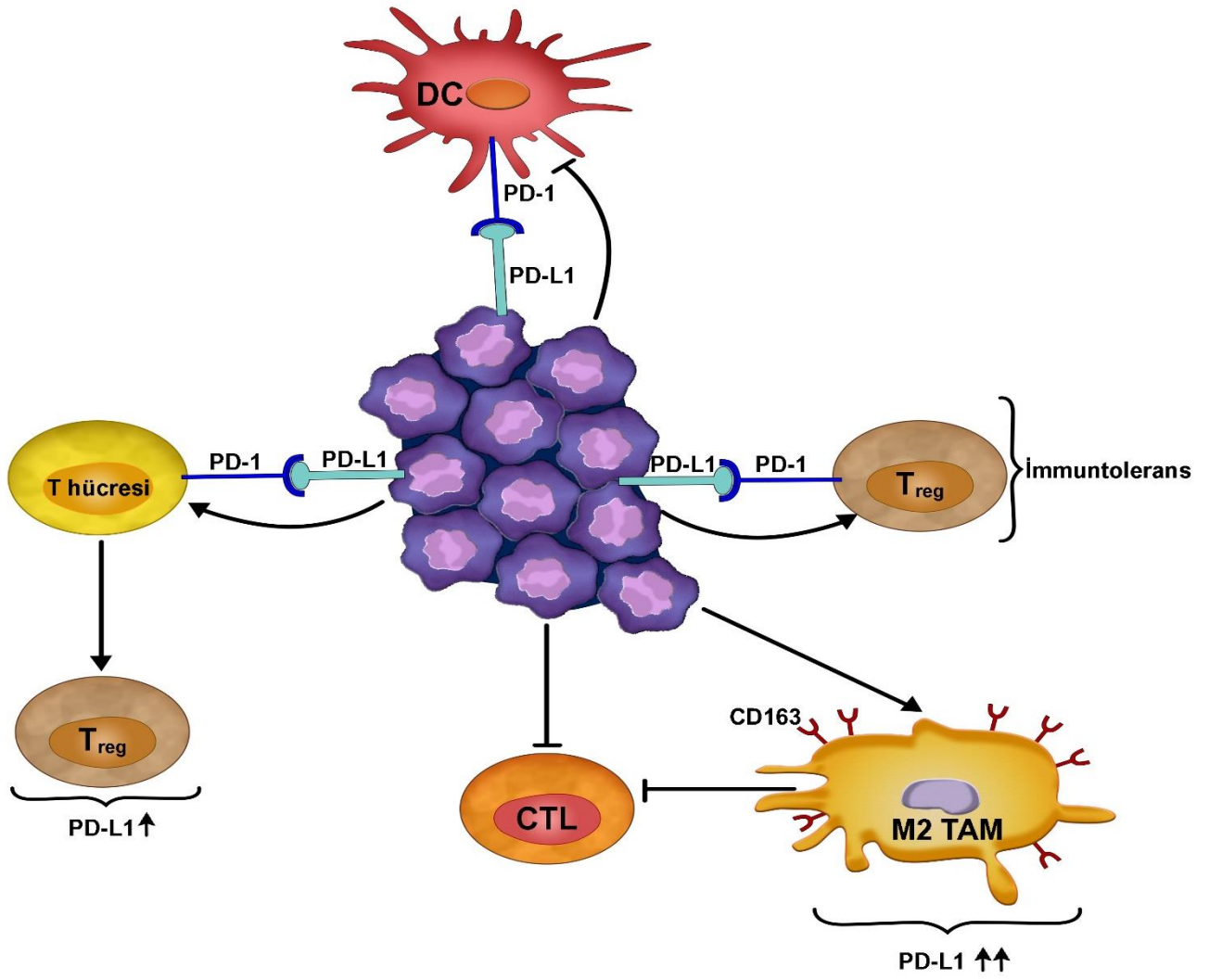
Tümör mikroçevresinde bahsedilen hücre çeşitliliği ve karmaşıklığı birçok immün kontrol mekanizması ile düzenlenmekteyken, bunlardan bir tanesi de programlanmış hücre ölüm reseptörüdür. PD-1, tümör ortamındaki immünstimülan ve immünsüpresan hücreler arasında adeta moderatör görevi olan ortak bir sinyal molekülüdür. 288 aminoasitten oluşan bir transmembran proteinini olan PD-1; CD4+ T lenfosit, CD8+ T lenfosit, NK hücreleri, B lenfositleri, CD11c+ dendritik hücreler, makrofajlar ve monositler tarafından hücre yüzeyine eksprese edilir ve CD279 ile tespit edilir (137).

Bağışıklık hücrelerinin bir çoğunda görülen PD-1, bu hücrelerin aktivitelerini sınırlayarak doku hasarını önleyen bir kontrol noktası olmasına rağmen, esas etkisini efektör T hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe ederek göstermektedir (138). Hedef hücre üzerindeki etkisini B7:CD28 ailesine ait iki ligand üzerinden gösterir: PD-L1 ve PD-L2.(37) PD-2 ligand üretimi daha sınırlı olduğundan esas etki PD-L1 üzerindedir.

PD-L1, CD274 geni tarafından kodlanan 290 aminoasitten oluşan bir transmembran

proteinidir (137).PD-1 ligandı; T lenfositleri, B lenfositleri, dendritik hücreler, doku makrofajları ve solid tümör hücre yüzeylerinde eksprese edilir (139, 140).Tümör hücresi tarafından noninflamatuvar kalıcı olarak, T lenfosit tarafından ise inflamatuvar geçici olarak üretilir (94).INF- α , INF- γ , IL-4, granülosit koloni uyarıcı faktör gibi sitokinler sayesinde ve akut enfeksiyon sırasında seviyesi artar (141).Göz ve plasenta gibi organların otoimmün yanıtlardan korunması için bu gibi ayrıcalıklı organlarda ayrıca yüksek seviyelerde bulunur (142).

Tümör hücresinin PD-L1 sahibi olması, immüniteden kaçabilmesine ve dolayısı ileimmünsüpresif bir etki ile hücre ölümünden korunabilmesine imkan sağlar (143).Tümör mikroçevresinde PD-1'in Treg üzerindeki PD-L1'e bağlanması sonucu, Treg'lerin immün tolerans ortamını sürdürmesine neden olur (139).Dolayısı ile antitümör efektör T lenfositlerin anerjisi sonucu tümör hücresi apoptozdan korunmuş olur (139).PD-L1 etkileşimi, dendritik hücrelerin antijen sunma kabiliyetini de bozarak antitümör immün yanıtı zayıflatır (139).Tümör mikroçevresinde PD-L1 sinyal yolağı sayesinde T hücresinden Treg polarizasyonu artar, akabinde Treg'ler diğer immün hücrelerdeki PD-L1 ekspresyonunu artırarak tümörögenез siklusu oluştururlar (144,145). Ayrıca tümör hücreleri, hem T lenfosit hem de TAM'ların üzerindeki PD-1' e bağlanarak PD-L1 seviyesinin ve efektör T hücre apoptozunu artırır, nihayetinde etkili CD+4 T hücre cevabına ve doğrudan tümör apoptozuna engel olur (146, 147, 148).



Şekil 9: Tümör hücresinin PD-1 / PD-L1 aracılığı ile mikroçevre hücreleri üzerindeki etkileşimi

BBSCC dahil birçok malignitede PD-L1 pozitifliği gösterilmiş, ayrıca kötü prognosis ile ilişkilendirilmiştir (137, 149, 150, 151).PD-L1'e karşı geliştirilmiş antikorlar ile akciğer kanseri, melanom gibi birçok malignitede cevap alındığı görülmüştür (152).Antikorlar ile ligand bloke edilmesi sonucu efektör T hücre sayı, yanıtı ve antitümör sitokin seviyesi artmıştır (153). Bu yüzden immün kontrol noktası inhibisyonu birçok malignite türünde umut ışığı olmuştur.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Deney Grubu ve Seçilen Örneklerin Tanımı

Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından baş boyun kanseri teşhisi konmuş 47 hastanın tümör dokularından ve tümör çevresi olarak sağlıklı dokularından alınmış olan örnekler kullanılmıştır. Çalışmaya katılan gönüllülere işlem öncesinde yapılacak araştırma ile ilgili detaylı bilgi verilerek bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır. Çalışmamız için İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı'ndan 2020/1778 numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

Hastaların baş ve boyun bölgesinde lokalize skuamöz hücre kaynaklı kanserlerinin olması ve bu hastalıktan ötürü kliniğimizde opere edilmesi çalışmaya dahil edilme kriterlerini oluşturmaktadır. Çalışmaya katılan hastaların klinik değerlendirmeleri ve doku örneklerinin toplanması İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiş olup laboratuvar çalışmaları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında yürütülmüştür.

Her bir hastadan alınan tümör ve tümör çevresi (sağlıklı) doku örnekleri, içerisinde 500uL RNAlater (Merck) bulunan 2ml'lik kriyotüplerde stoklanmış, deneysel çalışmalar başlayana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Gen ekspresyonu çalışmaları için alınan doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Hastalardan alınan doku örnekleri ile birlikte hasta yaşı, cinsiyeti, kan değerleri ve sigara, alkol kullanımı ve aile öyküsü gibi demografik parametreler de gen ekspresyonu değişimleri ile karşılaştırılmak üzere kaydedilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Kitler

3.2.1. Cihazlar ve Gereçler

Pipet takımı (Eppendorf)

Homojenizatör (ISOLAB)

Vorteks (Biosan Microspin FV-2400)

Mikrosantrifüj (Alfagen Mini-14K)

Hassas terazi (Mettler)
NanoDrop 2000 (ThermoFischer)
Real Time PCR Cihazı Biorad CFX Connect
Buzdolabı (+4°C)
Buzdolabı (-30°C)
Ultra Derin Dondurucu (-80°C)
Laminar Flow RNA İzolasyon Kabini

3.2.2. Kimyasal Malzemeler ve Kitler

RNAlater (Merck)
%99 Etanol (Sigma-Aldrich, Almanya)
İzopropil Alkol (Sigma-Aldrich, Almanya)
Bidistile su
RNAzol® RT-RN190 (Mrc Gene, USA)
BAN (4-bromoanisol)
SCRIPT cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience, Almanya)
SYBRMaster Mix (Jena Bioscience, Almanya)

3.3. Dokudan RNA İzolasyonu

3.3.1. RNA İzolasyonunda Kullanılan Malzemeler ve Hazırlık Aşaması

Her bir hasta için 1 tümör 1 tümör çevresi olmak üzere iki farklı doku toplanmış ve bu dokular hasta numaraları ile birlikte, sırasıyla, T ve N olarak kodlanmıştır.

RNAzol RT (Mrc) kullanılarak dokudan RNA izolasyonu yapılmıştır. Çalışma öncesinde farklı aşamalarda kullanılacak olan %50'lik etil alkol, %75'lik etil alkol, izopropil alkol, BAN solüsyonları 50ml'lik falkonlara alınarak hazırlanmıştır. Doku parçalamada kullanılacak cihazın temizliği için bidistile su ve %99'luk etil alkol solüsyonları da aynı şekilde 50ml'lik falkonlarda çalışma öncesi hazır edilmiştir.

3.3.2. Doku Örneklerinin Parçalanması

Parçalamada kullanılacak olan trizol (RNAzol) steril haldeki mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. -80°C’de saklanan dokular çözündürülmüş ve hassas terazide her bir dokudan 40-60mg arası tartılmıştır. Dokulardan alınan parçalar RNAlater ve diğer kirliliklerden arındırılmak üzere, tartım sonrası, %50 konsantrasyonda hazırlanan etil alkol solüsyonu ile kısa bir süre yıkanmış ve ardından kuru bir peçete yardımıyla emdirilerek alkol kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan dokular 750uL’lik trizol bulunan mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve homojenizatör yardımıyla 2-3 dakikalık parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Parçalama sırasında kuru buzda çalışılmış olup örneklerin köpüklenmemesine ve ısınmamasına dikkat edilmiştir. Her bir dokunun parçalanma işleminden sonra kullanılan homojenizatör öncelikle distile su ardından %99’luk etil alkol ve sonrasında yine distile sudan geçirilerek cihazın temizliği sağlanmış ve örnekler arasında kontaminasyon ihtimalinin önüne geçilmiştir.

3.3.3. DNA ve Protein Presipitasyonu

Parçalanmış dokulara 400uL hacimde bidistile su eklenerek güçlü bir şekilde vorteks yapılmıştır. Bu işlem DNA ve protein yapılarının presipite olarak santrifüj sonrası dipte kalmasını sağlamaktadır. Oda sıcaklığında 15 dakikalık inkübasyonun ardından 12.000g’de 15 dakika santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası her bir tüpteki örnek pellet ve süpernatant şeklinde ayrılmıştır.

Üstteki sıvı faz olan süpernatanttan 750uL hacim yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve daha ileri DNA kontaminasyonunu elimine etmek için BAN (4-bromoanisol) solüsyonu kullanılmıştır. Bu işlem için her bir tüpe 5uL BAN eklenerek örnekle iyice karışması sağlanmış ve 5 dakika 4-25°C’de inkübasyonu takiben 12.000g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında DNA ve protein yapıları pellet şeklinde ayrılmıştır. Oluşan süpernatanttan 500uL yeni bir mikrosantrifüj tüpüne transfer edilmiştir.

3.3.4. RNA Presipitasyonu

500uL hacimde alınan süpernatanta 1:1 oranında (500uL) izopropanol eklenmiş, 10 dakika 4-25°C’de inkübe edilmiş ve 12.000g’de 10 dakika santrifüj edilerek RNA presipitasyonu sağlanmıştır. Bu aşamada santrifüjden çıkarılan örneklerde RNA tüpün en altında pellet halinde edinilmiştir. Süpernatant pellete dokunulmadan dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır.

3.3.5. RNA Yıkama ve Çözdürme

Mikrosantrifüj tüplerinde pellet halinde edinilen RNA örnekleri ortam kirliliklerinden arındırılmak için 400uL hacimde %75'lik etil alkol ile 2 kez yıkanmıştır. Bu aşamada ilk yıkama esnasında etil alkol eklenen tüpler pelletin biraz daha belirgin hale gelmesi için buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiş ve ardından 8.000g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı pellete dokunulmadan ortamdan uzaklaştırılmış ve aynı işlem inkübasyon aşaması dışında bir kere daha tekrarlanmıştır. Tüpler son yıkamanın ardından hiç alkol kalıntısı kalmayacak şekilde temizlenmiş ve kuruması için 2 dakika bekletilmiştir. Alkol kalıntılarından tamamen arındırılan pelletlere 50uL bidistile su eklenerek 2-5 dakika arası vorteks yapılmış ve RNA'nın çözünmesi sağlanmıştır.

3.3.6. Total RNA Konsantrasyonun ve Saflığının Ölçülmesi

Elde edilen RNA örnekleri izolasyon işlemini takiben NanoDrop 2000 (Thermo Fischer) cihazında 260nm, 230nm ve 280nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Öncelikle RNA'ların elute edildiği solüyon olarak bidistile su 2uL hacimde alınmış ve cihazda blank olarak kaydedilmiştir. Ardından her bir örnekten 2uL alınarak tek bir cihazda ölçümleri tamamlanmıştır. RNA saflıkları OD_{260}/OD_{230} değeri ≈ 2.0 aralığında olan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. Ölçümleri tamamlanan RNA konsantrasyonları cDNA çevrimi öncesinde 100ng/ul'ye eşitlenmiştir.

3.4. cDNA Sentezi

Baş boyun dokularından elde edilen total RNA'lar Jena Bioscience SCRIPT cDNA Sentez Kiti kullanılarak ters transkripsiyon işlemi ile komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilmiştir. Bu işlem için kit protokolüne uygun olarak Tablo 12'de verilen protokole göre PCR Mix karışımı hazırlanmış, total hacim 20uL olacak şekilde 0,2ml hacimli PCR tüplerine dağıtılmış ve konsantrasyonları eşitlenen RNA örnekleri 2uL hacimde eklenerek PCR Mixi ile karıştırılmıştır. Tüm hazırlık aşamaları buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Reaktifler	Hacimleri (µL)
RNase free su	10,5
Script RT buffer	4
dNTP karışımı	1
Oligo dT Primer	0,5
TT	1
RNase inhibitörü	0,5
RT Enzimi	0,5
RNA kalıp	2

Tablo 12: cDNA PCR mixi içeriği (örnek başına)

Reaksiyon karışımı ve total RNA örnekleri eklenen tüpler Biorad CFX Connect cihazına alınarak Tablo 13'te verilen sıcaklık ve süre koşullarında inkübe edilmiştir. Sıcaklık ve süre koşulları kullanılan kitin içeriğine uygun şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

Sıcaklık	Süre
42°C	10 dakika
50°C	60 dakika
70°C	10 dakika

Tablo 13: cDNA çevrimi için sıcaklık-süre protokolü

3.5. Real Time PCR (qRT-PCR) Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Kantitatif Analizi

Sentezlenen cDNA örneklerinden uygun primerler ile Jena Bioscience qPCR Sybr Master Mix kiti kullanılarak gen ekspresyonu analizi gerçekleştirilmiştir. Primer olarak, araştırılmak üzere seçilen CD163, CD274, CD86, FOXP3, FUT4 ve ITGAX genleri ile internal kontrol için housekeeping olarak GAPDH geni kullanılmıştır. Primerler dizileri ve Tm sıcaklıkları Tablo 14'te verilmiştir. Total hacmi her bir örnek için 20µL olacak şekilde 0,6µL forward primer, 0,6µL reverse primer, 6,8µL PCR grade su ve 10µL qPCR SYBRMaster Mix'i

içeren reaksiyon karışımı her bir primer için ayrı olarak hazırlanmıştır. Her primer için hazırlanan Mix 96 kuyulu Real-Time platelere 18uL hacimde dağıtılmış, daha sonra kuyulara 2uL cDNA örnekleri eklenmiştir. Negatif kontrol olarak her bir prob için birer kuyu ayrılmış ve içerisine cDNA örneği eklenmeden yalnızca reaksiyon karışımı eklenmiştir.



CD163	Tm: 62,3°C
F: 5'-ACA TAG ATC ATG CAT CTG TCA TTT G-3'	R: 5'-CAT TCT CCT TGG AAT CTC AGT TCA-3'
Cd274	Tm: 51°C
F: 5'-GGT GGT GCC GAC TAC AAG CGA-3'	R: 5'-AGG CTG AGG GCT ACC CCA AGG-3'
CD86	Tm: 63°C
F: 5'-ACA GCA GAA GCA GCC AAA AT-3'	R: 5'-AAG TAT ATG GGC CGC ACA AG-3'
FoxP3	Tm: 55.7°C
F: 5'-ACA CCA CCC ACC ACC GCC ACT-3'	R: 5'-AGT CTC TGG AGC AGC-3'
FUT4	Tm: 63°C
F: 5'-AAT TGG GCT CCT GCA CAC-3'	R: 5'-TAT GGC AGT GGA ACC TGT CA-3'
ITGAX	Tm: 55.7°C
F: 5'-ATG GAG CCT CAA GAC AGG AC-3'	R: 5'-GGA TCT GGG ATG CTG AAA TC-3'

Tablo 14: qRT PCR için kullanılan primer dizileri ve Tm sıcaklıkları

Her bir primer için ayrı olarak dizayn edilen platelerin, Real Time PCR cihazında Tablo 15'te verilen inkübasyon süreleri ve sıcaklıklarında reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon ve Polimeraz Aktivasyon	95°C	2 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95°C	15 saniye	45 döngü
Bağlanma ve Uzama	Her primer için kendi Tm derecesi	1 dakika	

Tablo 15: qRT-PCR reaksiyon protokolü

Reaksiyon tamamlandığında CT değerleri cihaz tarafından belirlenmiştir. Örneklerin ΔCT değerini belirlemek için tüm hedef genlerin CT değerlerinden, housekeeping gen olarak seçilen GAPDH'nın CT değeri çıkarılmıştır. $\Delta\Delta CT$ değerini hesaplamak için ise tümör dokularının ΔCT değerinden çevre (sağlıklı) dokuların ΔCT değeri çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlardan daha sonra $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile kat değişimi (fold change) değerleri hesaplanmış ve log2 tabanına çevrilerek sonuç değerlerine ulaşılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin SPSS 21.0 programı kullanılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak alınmıştır. Gruplar arası demografik verilerin karşılaştırılmasında One-Way Anova ve Student't testleri kullanılmıştır.

4. Bulgular

Çalışmamızın örneklem grubunu, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından baş boyun kanseri teşhisi konmuş 47 hastanın tümör dokuları ve aynı hastaların tümör çevresi sağlıklı dokuları oluşturmaktadır. Çalışma gruplarına ait biyokimyasal ve demografik parametreler Tablo 16 ve Tablo 17’de yer almaktadır. Buna göre çalışma grubu 12 kadın (%25,5) ve 35 erkek (%74,5) hastadan oluşmaktadır. Grubun yaş ortalaması $59,38 \pm 8,8$ ’dir.

Biyokimyasal Parametreler (n=47)	X $\pm$ SD
Yaş (Yıl)	59,38 $\pm$ 8,8
WBC	9,75 $\pm$ 3,29
RBC	4,62 $\pm$ 0,63
HGB	13,57 $\pm$ 1,91
PLT	288,66 $\pm$ 66,32
NEUT	6,85 $\pm$ 3,59
LYMP	1,96 $\pm$ 0,90
MONO	0,72 $\pm$ 0,26
NEU%	67,16 $\pm$ 13,53
MONO%	7,70 $\pm$ 2,89
LYMP%	22,49 $\pm$ 11,48
Glukoz (mg/dl)	118,09 $\pm$ 46,80
KRE	0,92 $\pm$ 0,50
Na	140,42 $\pm$ 2,64
K	4,38 $\pm$ 0,56
Cl	99,58 $\pm$ 3,20
Ca	9,29 $\pm$ 0,82
AST	22,74 $\pm$ 12,68
ALT	24,58 $\pm$ 36,12
Amilaz	68,56 $\pm$ 35,86

Lipaz	30,61±17,79
Total Protein	6,70±0,60
Albumin	4,00±0,54
Total Bilirubin	0,60±0,31
Direk Bilirubin	0,27±0,20
İndirek Bilirubin	0,26±0,20
Trigliserid	118,51±41,75
HDL	36,69±21,86
LDL	97,52±57,08
VLDL	18,97±15,58
Fe	70,94±42,04
Ferritin	160,61±193,08
DBK	101,27±122,52
TDBK	167,21±156,90
B12	344,44±235,46
CRP	34,64±58,39
TSH	5,35±9,59
FT3	4,35±1,17
FT4	12,49±8,02
PTH	27,76±28,81
FOLAT	3,13±4,24
VitD	12,01±6,08
INR	1,39±2,48
PTZ	12,79±3,67
APTT	26,69±5,43

Tablo 16: Çalışma grubuna ait biyokimyasal parametreler

Demografik Parametreler (n=47)	
Cinsiyet (kadın/erkek)(n)	12/35
Alkol kullanımı (%)	%22,2
Sigara Kullanımı (paket/yıl)	
<50 (%)	%45,7

≥50 (%)	%54,3
Aile Öyküsü (%)	%22,2
KOAH (%)	%13,3
Hipertansiyon (%)	%20
Diabetes Mellitus (%)	%13,3
PNI (%)	%42,2
PVI (%)	%51,1
Tümör Evre	
1-2 (%)	%22,2
3-4 (%)	%77,8
Nod Tutulumu(%)	%42,2
ENE(+)	%23,4
Pre Op RT/KT alma (%)	%8,9
Tümörün primer lokalizasyonu	
Dudak (%)	% 2,1
Hipofarenks (%)	% 2,1
Larenks (%)	% 46,8
Oral Kavite (%)	% 34
Orofarenks (%)	% 4,3
Trakea (%)	% 2,1
Tükürük Bezi (%)	% 4,3
Diferensiasyon	
Az (%)	% 13
Orta (%)	% 82,6
İleri (%)	% 4,4

Tablo 17: Çalışma grubuna ait demografik parametreler

Yapılan istatistiksel analizlere göre sigara kullanımı, tümör lokalizasyonu, nod tutulumu, perinöral invazyon (PNI) ve perivasküler invazyon (PVI) değerleri gibi demografik parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Çalışmaya katılan hastaların %46,8’inde tümörün primer lokalizasyonunun larenks, %36’sında ise oral kavite olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte hastaların %82,6’sında orta derece diferansiasyon saptanmış olup biyopsi sonuçlarına göre hastaların %72,3’ünün skuamöz hücreli karsinom;

%4,3'ünün ise invaziv skuamöz hücreli karsinom olduğu kaydedilmiştir.

Real Time PCR Ekspresyon Bulguları

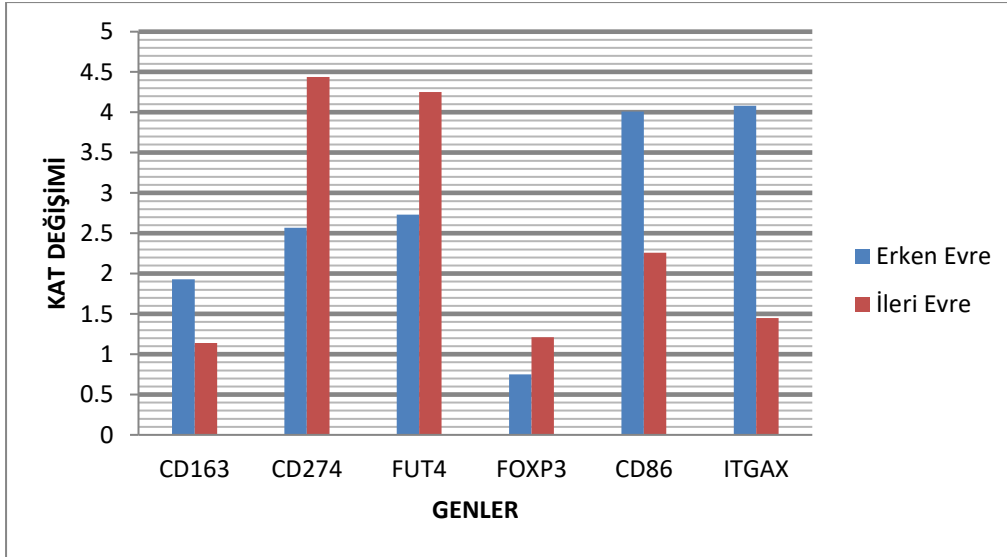
6 aday genin (CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86 ve ITGAX) tümör ve sağlıklı dokularda total RNA ekspresyon düzeyleri internal kontrol olan GAPDH geni kullanılarak rölatif kantitasyon ile belirlenmiştir. PCR optimizasyonları ile her bir aday genin primer çifti için bağlanma sıcaklıkları (T_m dereceleri) belirlenmiş ve reaksiyonlar bu sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir.

Tümör dokusunda CD274, FUT4, FOXP3 ve CD86 gen anlatımları sağlıklı dokuya göre anlamlı olarak artış göstermiştir ($p < 0,05$) (Tablo 18).

Gen	Kat değişimi (min-maks)	P değeri	%95 güven aralığı
CD163	1,32 (-11,47-7,87)	0,089	0,20-2,86
CD274	3,85 (-4,72-12,84)	0,001*	2,41-5,20
FUT4	3,79 (-4,82-12,78)	0,001*	2,52-5,28
FOXP3	1,23 (-8,48-8,42)	0,041*	0,04-2,25
CD86	2,41 (-5,95-14,31)	0,001*	1,01-3,83
ITGAX	1,89 (-22-10,82)	0,205	0,64-3,01

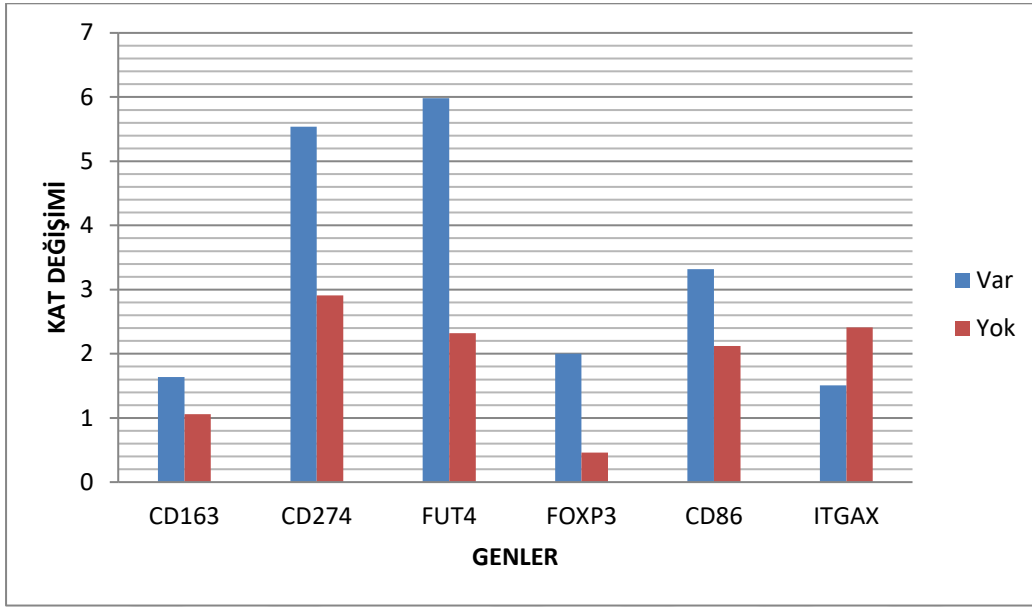
Tablo 18: Genlere ait kat değişim tablosu

Gen kat değişimleri erken ve ileri evre tümörlerde karşılaştırıldığında ileri evre tümörlerde CD274, FOXP3 ve FUT4 gen anlatım düzeylerinde artış görülmesine karşın istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmamıştır ($p > 0,05$) (Grafik 1).



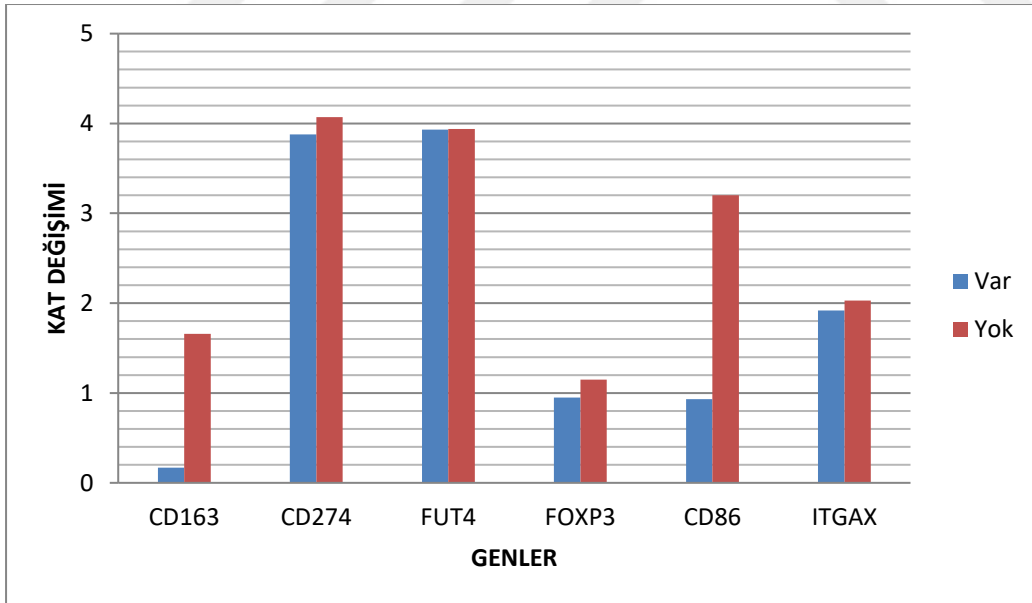
Grafik 1: Erken ve ileri evre tümör gruplarında gen kat değişimlerinin karşılaştırılması

Çalışma grubunu oluşturan hastaların %42,2'sinde nod tutulumu kaydedilmiş olup nod tutulumu olan hastalarda FUT4 gen kat değişiminin istatistiksel olarak arttığı saptanmıştır ($p=0,020$, %95 güven aralığı= 0,62-6,69) (Grafik 2).



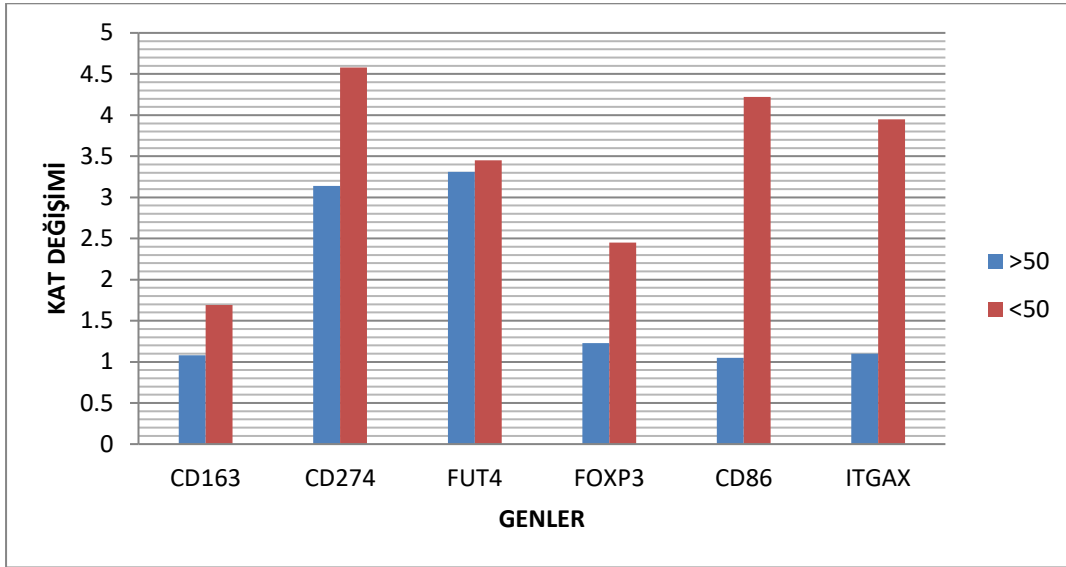
Grafik 2: Nod tutulumuna göre gen kat değişimlerinin karşılaştırılması

Grafik 3’te ailesinde kanser geçmişi olan ve olmayan hastaları karşılaştırdığımızda gen anlatımlarına ait istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p>0,05$).



Grafik 3: Aile Hikayesinin varlığına göre gen kat değişimlerinin karşılaştırılması

Paket/yıl oranına göre sigara içiciliği ve gen anlatımları arasındaki ilişki incelendiğinde CD86 gen anlatımının 50 paket/yıldan daha az sigara içenlerde istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p=0,033$, %95 güven aralığı= 0,26-6,07) (Grafik 4).



Grafik 4: Sigara içme miktarına göre gen kat değişimlerinin gösterimi

Tablo 19’da perinöral invazyon, perivasküler invazyon ve ENE varlığına göre gen kat değişimleri karşılaştırılmıştır. Perivasküler invazyonu olmayan grupta CD163 gen anlatımının anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p=0,05$, %95 Güven aralığı=0,004-5,11). ENE varlığına göre ise FUT4 gen anlatımının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği saptanmıştır ($p=0,18$, %95 Güven aralığı=1,09-7,60)

Genler	Perinöral İnvazyon		Perivasküler İnvazyon		ENE	
	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok
CD163	1,83±3,73	0,95±4,55	0,03±1,08	2,59±0,62*	2,93±1,01	0,73±0,78
CD274	5,42±4,50	3,01±4,75	4,27±1,03	3,77±0,99	5,87±1,37	3,43±0,81
FUT4	4,92±4,42	3,25±1,02	3,88±1,18	4,01±3,74	7,13±3,82**	2,78±0,84
FOXP3	1,36±0,95	0,93±0,83	0,12±0,75	2,15±0,97	2,62±0,89	0,62±0,76
CD86	3,41±0,99	2,10±0,88	2,11±0,79	3,21±1,06	3,58±0,72	2,35±0,83
ITGAX	1,12±1,96	2,58±1,00	0,96±1,56	3,16±1,10	0,81±3,11	2,37±0,88

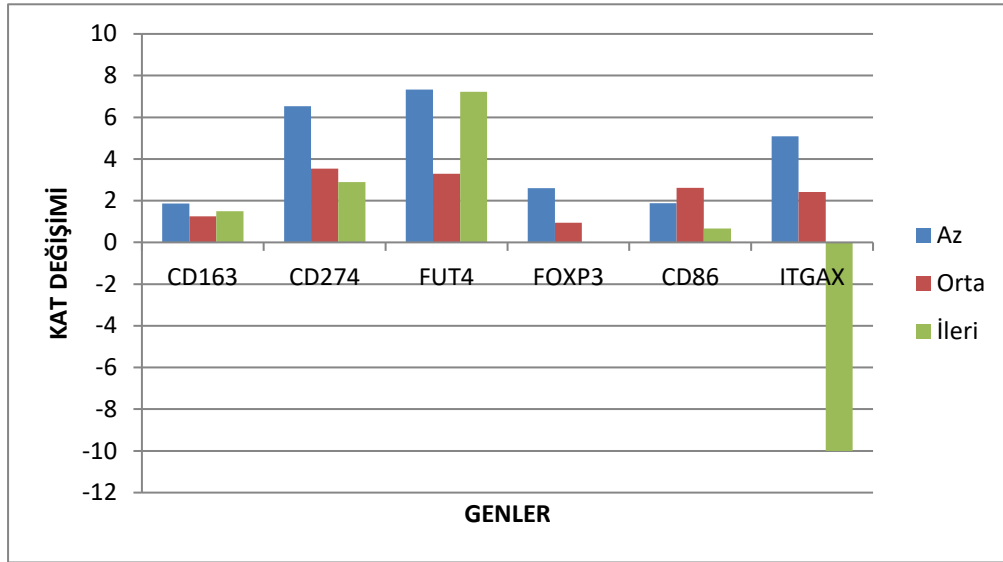
* $p=0,05$, %95 Güven aralığı=0,004-5,11

** $p=0,18$, %95 Güven aralığı=1,09-7,60

Tablo 19: Perinöral invazyon, Perivasküler invazyon ve ENE varlığına göre gen anlatımlarının gösterilmesi

İleri tümör diferansiasyonuna sahip hastalarda ITGAX gen anlatımı hem az

diferansiasyon ($p=0,001$, %95 güven aralığı= 8,61-25,58) hem de orta derece diferansiasyon ($p=0,001$, %95 güven aralığı= 7,02-21,80) görülen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (Grafik 5).



Grafik 5: Tümör diferansiasyonuna göre gen kat değişimlerinin gösterilmesi

5. Tartışma

Baş ve boyun kanserleri benzer bir patolojik köken paylaştan bir grup neoplazm içermektedir. %90'ından fazlasını skuamöz hücreli karsinomların oluşturduğu baş boyun maligniteleri, dünya genelinde görülen tüm malign neoplazmlar arasında 6. sırada yer almaktadır (154). Örneğin GLOBOCAN'ın 2018 yılı verilerine göre oral kavite kanserleri için her yıl yaklaşık olarak 400.000'e yakın yeni vakaya tanı koyulduğu rapor edilmiştir (41). Vaka sayılarının 2012 yılı verilerine (155) kıyasla önemli derecede artmış olması dikkat çekmektedir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre tütün ve alkol kullanımı ve HPV enfeksiyonları bu malignitelerin en bilinen risk faktörlerini oluşturmakta olup bu faktörlerin etkinliği coğrafi dağılım ve hastalığın klinikopatolojik özelliklerine göre farklılık göstermektedir (156). BBSCC, genel olarak, cerrahi müdahale ve radyoterapi sonrası bölgesel nüks insidansının yüksekliği ile ilişkilendirilmektedir. Hastalığın 5 yıllık sağ kalım oranının %60'ın altında olduğu bilinmekle birlikte cerrahi ve adjuvant yöntemlerin bir kombinasyonu ile tedavi edilen bir hastada bile BBSCC'nin nüks oranının %18-76 arasında olduğu vurgulanmaktadır (157).

Diğer tümör tiplerinde olduğu gibi BBSCC oluşumunda ve patogenezinde de çoklu gen ve proteinler arasındaki bir dizi etkileşim söz konusudur. Çoklu faktörlerin kombinasyonunun bir sonucu olarak farklı kromozom ve genlerde meydana gelen moleküler genetik interaksiyonlar neticesinde hastalığın patogenezi oldukça karmaşık tablo oluşturmaktadır. Yakın zamanda, tümöral dokuda meydana gelen değişimlerin yanı sıra tümör mikroçevresinde yer alan yapıların da tümör progresyonu ile birlikte hastalığın patogenezi ve klinik seyrine katkı sağlayabileceği ortaya koyulmuştur (156). Literatürde çeşitli çalışmalar ile BBSCC gelişimi ve progresyonunda bağışıklık hücrelerinin ve bu hücrelerin alt kümelerinin rolüne değinilmiş olmasına rağmen; tümör gelişiminin ve takibinin sağlanabilmesi, tümöre yönelik alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi ve hatta mikroçevredeki tümör oluşturabilecek değişimlerin öngörülebilmesi açısından tümör mikroçevresinin heterojenliği ve bu çevrede yer alan hücrelerin karmaşık interaksiyonlarına yönelik daha kapsamlı analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Nitekim, malignitelerin patogenezinde tümör mikroçevresinin rolüne ve oluşturulan bağışıklık yanıtına ilişkin çalışmalar giderek değer kazanmaktadır. BBSCC; yıllık insidansının alt bölge ve cinsiyet faktörlerine bağlı olarak değişmesiyle birlikte 11,2/100.000'e yükselmesi (158), ileri evre tümörlerinde 5 yıllık sağ kalımın %30-40'lara düşmesi (17), lokal

ve uzak metastaz oranının sırasıyla %50 ve %20'nin üzerinde olması (17), uygun tedaviye rağmen nüks oranlarının %30-50 arasında değişmesi (159) ve bu faktörlerle birlikte hastanın yaşam kalitesinin önemli ölçüde etkilendiği kanserler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu bağlamda, son yıllarda kanser araştırmalarında araştırmacı odakları, gerek kişiye özgü prensiplere gerek tümöre özgü tedavi seçeneklerine kaymaktadır. Tümör mikroçevre elemanları da tümör proliferasyonu, progresyonu, metastaz yeteneği gibi etkileri ile kanser araştırmalarında dikkat çekici bir noktaya gelmiştir. Literatür incelendiğinde, BBSCC ve tümör mikroçevre elemanlarının ilişkisi açısından eksik olduğu ve hastalık mekanizması ile ilişkisine dair yeterli çalışmaya sahip olmadığı görülmüştür. Bu amaçlar doğrultusunda, tez çalışmamız kapsamında BBSCC tanısı konmuş hastalardan alınan tümör ve çevre doku örneklerinde tümör mikroçevresinde yer alan hücre grupları için belirlemiş olduğumuz aday genlerin (CD163, CD274, FUT4, FOXP3, CD86 ve ITGAX) sağlıklı doku ve tümöral doku arasındaki ekspresyonel değişimlerin analizini yaparak hastalık mekanizması üzerindeki etkisini ve potansiyelini araştırmayı amaçladık.

İmmün sistem hücreleri eksprese ettikleri reseptör-ligandlar ve salgıladıkları sitokin, interlökin gibi moleküller dolayısıyla birbirleri üzerinde ve tümör dokusu üzerinde farklı anahtar etkilere sahiptir (7, 160, 161). Literatürde tümör mikroçevresinde yer alan TAM, TAN, TAB, Treg, DC hücrelerinin tümör proliferasyonu, progresyonu ve tümörün metastaz yeteneği üzerindeki etkinliklerine dair bulgular mevcuttur. Yapılan çalışmalar bu hücre gruplarını ayrı ayrı incelemiş olmasına rağmen, yukarıda bahsedilen aday genleri bir arada inceleyen ve karşılaştıran çalışmaların kısıtlı olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, yanıtını araştırdığımız tüm gen ekspresyonlarının tümör dokularında sağlıklı dokuya kıyasla yüksek bulmakla birlikte; CD274, FUT4, FOXP3 ve CD86 gen anlatımları istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir.

Çok sayıda çalışma TAM'ların birçok solid tümörde karsinogenez sürecinin başlamasında ve ilerlemesinde rol oynadığını göstermektedir (7, 162-165). CD163, M2 makrofajları için oldukça spesifik bir belirteç olarak kabul edilmektedir. Maniecki vd. tarafından CD163'ün artan ekspresyonunun mesane kanseri hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (166). Buna benzer olarak farklı çalışmalarda CD163+ TAM'ların meme kanseri (167) ve oral skuamöz hücreli karsinomlarda (168) tümör boyutu ve hastalığın evresi ile korele olarak artış gösterdiği vurgulanmıştır. Bizim sonuçlarımıza göre ise CD163 gen ekspresyonunun, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, tümör dokusunda sağlıklı dokuya göre daha fazla eksprese edildiği gözlenmiştir. Bu durumun, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının sınırlı olmasından kaynaklanabileceğini ve hasta sayısının artırılmasıyla literatüre uyumlu olarak istatistiksel açıdan daha anlamlı sonuçlara ulaşılabileceğini

düşünmekteyiz.

Öte yandan yine TAM'larla ilişkili olarak ekspresyon analizi yapılan CD274 geninin ürünü olan PD-L1, birtakım farklı moleküller ile birlikte kanser hücrelerinde “beni yeme” sinyalini oluşturmaktadır (76, 87). PD-1/PD-L1 sinyalizasyon yolağı ile TAM'lar direkt olarak doğal öldürücü hücrelerin (NK hücreleri) ve T lenfositlerinin sitotoksik etkinliğini sınırlandırmakta ve apoptotik olarak yıkımlarını indüklemektedir (90). Sonuçlarımıza göre tümör dokusunda CD274 ekspresyonu sağlıklı dokuya kıyasla anlamlı olarak artış göstermiştir. Bu anlamlı artış diğer mikroçevre hücrelerini indükleyerek hasta popülasyonumuzdaki hızlı progresyondan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Hem tümör hücresi hem mikroçevre hücresi arasında etkileşime sahip PD-1 / PD-L1 sinyal yolağı kanser immünitesinin merkezinde yer almaktadır. Hasta sayısı, tümör lokalizasyon çeşitliliğinin artırılması ve hasta takip süresinin uzatılması ile PD-1/PD-L1 sinyalizasyonunun, mikroçevre hücreleri ve prognoz üzerindeki anlamlı etkisi daha anlaşılır olacaktır.

TAM'lar aynı zamanda mikroçevrede yer alan immunosupresif (Treg) hücre popülasyonları üzerinde destekleyici; immunistimulan (dendritik hücreler) hücre popülasyonları üzerinde ise inhibitör aktivitesi dolayısıyla da tümör oluşumunu ve gelişimini stimule edici etkinlik sergilemektedir (76). Antitümör yanıtın bir inhibitörü olarak hizmet eden Treg'ler baskılayıcı sitokin salımı ile immun efektör olarak fonksiyon gösteren hücreleri (sitotoksik T lenfositler veya dendritik hücreler gibi) inhibe etmektedir (169). FoxP3 transkripsiyon faktörü, Treg gelişimi ve aktivitesi için kritik öneme sahip bir regülatördür (105). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, tümör mikroçevresinde FoxP3+ Treg birikiminin over kanseri ve pankreatik duktal adenokarsinoma sahip hastalarda kötü prognozla ilişkili olabileceğini göstermektedir (161). Çalışmamız çerçevesinde, sağlıklı dokuya göre tümör dokusunda ekspresyon düzeyi artan CD274'e paralel olarak FoxP3'ün ekspresyonunun da artmış olması mikroçevrede yer alan hücreler arasındaki bu etkileşimi destekler niteliktedir. Bu bulgulara ek olarak, ileri ve erken evrelerdeki tümör dokuları arasında CD274 ve FoxP3 gen kat değişiminin ileri evre tümörlerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Sonuçlarımız, hasta profilinin genişletilmesi ve örneklem sayısının artırılmasıyla, erken ve ileri evre tümörler arasında meydana gelen bu farklı değişimlerin izlenmesinde daha aydınlatıcı olacağını ve klinik kullanımla yararlanılabilecek potansiyel biyobelirteçler arasında olabileceğini düşündürmektedir. Bu biyobelirteçlerin özellikle tanı konması zor, klinik olarak belirginleşmeyen erken evre tümörlerinde noninvaziv olarak kullanıma girmesi ile hastalığın başlangıç aşamasında öngörülebilir ve önlenebilir olması hedeflenmelidir. Böylelikle hastaya uygulanacak kapsamlı destrüktif cerrahiler ve ağır kemoradyoterapi rejimleri yerine, daha

seçici ve koruyucu cerrahiler uygulanabilir. Belki de geliştirilecek hedefe yönelik immünoterapiler sayesinde noninvaziv tedaviler ile kür söz konusu olabilecektir. Ayrıca ileri evre ve özellikle nüks hastalarda gerek kurtarma tedavisi gerekse palyasyon amaçlı olarak bu biyobelirteçlerin işaret ettiği hücre gruplarının hedeflenmesi hastaların yaşam kalitesini yükseltmek açısından da anlamlı olacaktır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar hem solid tümörlerde hem de hematolojik kanserlerde immün yanıtın modülasyonunda B hücrelerinin rolüne değinmesine rağmen bu hücre gruplarına yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır (170). Fare otoimmün modeller üzerinde yapılan çalışmalar IL-10 veya PD-L1 gibi immün regülatör molekülleri eksprese eden regülatör B hücrelerinin, T hücre aktivitesi veya NK hücre yanıtını baskılamasının yanı sıra TAM'ları da stimule ederek yine antitümör yanıtı baskılayıcı etkinlik gösterebildiğini vurgulamaktadır (170, 171). Buna benzer olarak, farklı çalışmalarda regülatör B hücrelerinin, CD4+ T lenfositlerinin Treg'lere dönüşümünü desteklediği ortaya koyulmuştur (172, 173). B hücrelerinin antitümör yanıtı baskılamasına yönelik olarak yapılan moleküler temelli bir çalışmada ise EMT6 fare meme karsinom modelinde, tümör hücrelerine infiltre olmuş B hücrelerinin, dalak B hücrelerine göre CD80, CD86 ve PD-L1 ekspresyonlarında artış gözlemlendiği raporlanmıştır (174). Çalışmamızda CD86 ve CD274 ekspresyonunu birbiri ile korele artmış olması antitümöral cevabın bastırılmasını destekler niteliktedir. Bu anlamda literatür ile benzer sonuca ulaşılmış olmamız B hücrelerinin PD-L1 ile protümöral aktivitesini güçlendirdiği kanaatini oluşturmaktadır.

Mikroçevrede yer alan bu hücre gruplarıyla ilişkili olan dendritik hücreler ve B lenfositler ise tümör mikroçevresinde başlıca antijen işleyip sunan hücreler olup doğal ve kazanılmış bağışıklık hücreleri arasında bağlantı görevi görmektedirler (160). TAM'lar, Treg'ler, B lenfositler ve dendritik hücreler arasındaki interaksiyon kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışının altında yatan en önemli mekanizmadır (174). Oderup vd. CD4+ CD25+ Treg'lerin CTLA-4 aracılığı ile CD80 ve CD86 gibi ko-stimulatör moleküllerin ekspresyonlarını down-regüle ederek dendritik hücrelerin olgunlaşmasını baskıladığını ve dolayısıyla da zayıf bir sitotoksik T hücre yanıtının oluşmasına neden olduğunu raporlamışlardır(7, 175–177). Ekspresyon sonuçlarımıza göre CD86 gen kat değişimleri tümör dokusunda sağlıklı dokuya oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış; ek olarak ileri ve erken evre tümör grupları arasında kıyaslama yapıldığında erken evre tümörlerde CD86 ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum; tümör progresyonunun ve evresinin ilerlemesi ile birlikte stimülasyonları artan Treglerin dendritik hücreler üzerindeki baskılayıcı etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Çalışmamız BBSCC hasta örnekleri

üzerinden çıkan bu önemli bulgusu ve hipotezi ile hücreler arasındaki interaksyon dinamiklerinin daha net anlaşılması için literatüre sağlayacağı katkısı ile yeni çalışmalar için öncül niteliği taşımaktadır. Özellikle tümör progresyonunun erken evresinde CD86 ekspresyonunun yüksek görülmüş olması, antijen sunan hücrelerin karsinogenezin ilk aşamalarında immün sistem aktivasyonu için ne kadar aktif rol oynadığını göstermektedir. Fakat bu hücrelerin antitümör yanıtta başarılı olamaması halinde ise tümörün evresinin ilerleyerek CD86 ekspresyon seviyesinin düşmesi kaçınılmaz olmaktadır. İlerleyen zamanlarda özellikle ailesel ve etiyolojik risk faktörleri olan ya da müphem şikayetlere sahip hastalarda pretümöral fazda CD86 belirteci üzerinden yapılabilecek taramalar, kanser insidansında belirgin azalmalara katkı sağlayabilecek potansiyeldedir. Literatüre baktığımızda, BBSCC tümörleri ile ilişkili B lenfositlerin mikroçevre üzerindeki rolüne değinilmemiş olup çalışmamız bu konuya ışık olabilmesi açısından önemlidir. Bağlantıların klinik verilerle ilişkilendirilebilmesi, klinikte kullanılabilir belirteçler arasına girebilmesi için; ek hücresel elemanların ve TME tarafından salgılanan farklı moleküllerin eklenerek yapılabilecek kapsamlı moleküler ve genetik tekniklerle hastalık mekanizması üzerindeki etkinliğinin aydınlatılabilmesi, yeni araştırma konuları arasında olabileceği düşünülmektedir.

Bunun yanı sıra dendritik hücreler için yaygın olarak kullanılan tanımlama belirteçlerinden biri de Integrin alfa X ya da ITGAX olarak da bilinen CD11c'dir (178). İntegrinler, immün sistem elemanları ile hedef hücreler arasında T ve NK hücrelerinin sitotoksik etkinliklerine ve makrofaj, nötrofil, dendritik hücrelerin fagositik etkinliklerine aracılık edecek immünolojik sinaps oluşumunu sağlarlar (179, 180). Bu etkinlikleri dolayısıyla tümör mikroçevresinde yer alarak tümöral dokunun baskılanmasında rol oynamaktadırlar. Wang vd. CD11c+ immün hücrelerin infiltrasyon yoğunluğunun gastrit, mide polipleri ve mide kanseri hastalarında farklı düzeyde olduğunu göstermişlerdir (181). Buna göre, mide kanseri hastalarında CD11c ekspresyonlarının diğer gruplara göre önemli ölçüde arttığını; ancak bununla birlikte yüksek yoğunlukta intratümöral CD11c bulunan hastalarda kansere bağlı ölüm riskinin azaldığını raporlamışlardır. Araştırmacılar ayrıca, mide kanseri hastalarında CD11c ekspresyonunun her ne kadar ölüm ve nüks riski ile ilişkilendirilse de bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilemeyeceğini öne sürmüşlerdir (181). Çalışmamız kapsamında az, orta ve ileri derecede diferansiyasyon görülen hastalar arasında gen anlatımları karşılaştırıldığında ileri tümör diferansiyasyonuna sahip hastalarda ITGAX gen ekspresyonunun önemli ölçüde baskılandığı dikkat çekmektedir. Az (iyi) diferansiye kanser hücreleri bulunduğu organdaki normal hücrelere benzerlik yönünden daha yakın ve daha ılımlı biyolojiye sahipken; ileri (kötü) diferansiye hücreler daha agresif biyolojiye sahiptir. Tümör diferansiyasyonunun ilerlemesi ile

birlikte mikroçevrede yer alan Treg veya TAM hücre gruplarının dendritik hücreler üzerindeki etkinlerinin bu tabloya neden olabileceğini düşünmekteyiz. Özellikle nazofarenks karsinomlarında olduğu gibi undiferansiye tümörlerde radyoterapi etkinliğinin yüksek olması bilgisinden yola çıkarak; radyoterapinin Treg ve TAM'ların dendritik hücreler üzerindeki süpresyonunu bozması muhtemeldir. Dolayısı ile radyoterapi almış ya da alacak olan hastalarda dendritik hücreler üzerinden yapılacak immünoterapilerin tedavinin etkililiğine fayda sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Mikroçevrede yer alan bir diğer hücre grubu olan TAN'lar, organizmayı mikrobiyal enfeksiyondan koruyan baskın bağışıklık hücreleri olup granüllerindeki antimikrobiyal ve sitotoksik içerikleri serbest bırakarak veya diğer antitümör efektör hücreleri toplamak ve etkinleştirmek üzere birtakım immün modülatörleri salgılayarak tümöral hücreleri ortadan kaldırmaktadır (113). Öte yandan, tümör kaynaklı birtakım faktörler TAN'ları pro-tümör fenotipine dönüştürebilmektedir. TAN'lar, ürettikleri birtakım soluble faktörler ve proteinazlar aracılığıyla tümör büyümesini hızlandırırken bir yandan da tümör hücrelerinde epitelial-mezenkimal geçişi ve pre-metastatik niş oluşumunu indükleyerek tümör metastazını da teşvik edebilmektedir (113). Nötrofillerin karsinogenez sürecindeki antitümöral ve protümöral fenotip dönüşümü nedeniyle dual etkiye sahip olması; hastalığın klinik seyri ve hedefleme temelli tedavi uygulamaları açısından önemlidir. Güncel literatürde tümöral dokuda artmış nötrofil infiltrasyonu renal hücreli karsinoma (182), BBSCC (122), hepatoselüler karsinoma (183) ve kolorektal karsinoma (184) vakalarında kötü prognoz ve olumsuz sonuç ile ilişkilendirilmektedir. Yüksek intratümöral nötrofil mevcudiyetinin lenf düğümü metastazı, tümör derecesi ve tümör evresi ile korele olduğu gösterilmiş olup tümördeki yüksek nötrofil yoğunlukları kötü prognoz için bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (113, 122, 182-185). Çalışmamız kapsamında TAN'lar için bir moleküler belirteç olarak CD15 ve Lewis-X olarak da bilinen FUT-4'ün gen ekspresyonları tümöral ve sağlıklı dokuda karşılaştırılmış ve FUT-4 ekspresyonunun tümöral dokuda anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir. Önceki çalışmalar, FUT-4'ün nötrofillerin yüzeyinde ifade edildiğini ve bakteriyel enfeksiyon, dölleme, inflamasyon ve tümöröenez dahil olmak üzere bazı patofizyolojik süreçlerde ekspresyonlarının arttığını göstermektedir (186, 187). FUT-4'ün ekspresyonel artışının meme kanseri, tiroid tümörü ve safra kanalı neoplazmı gibi çeşitli kanserlerde prognoz ve hayatta kalma ile ilişkili olduğunu gösteren bulgular da literatürde yer almaktadır (187-89). Bununla birlikte, literatürde nötrofil infiltrasyonunun, tümörün nodal yayılımı ve metastaz yeteneği ile ilişkisine yönelik yapılan çalışmalara paralel olarak örneklem grubumuzda ekstra nodal yayılımı (ENE) mevcut olan hastalarda ENE(-) hastalara göre FUT-4 ekspresyonunun anlamlı

derecede artmış olması ulaştığımız bir diğer önemli bulgudur. ENE (+) pozitifliğinin sağ kalım açısından hastalarda oldukça kötü prognostik faktör olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (190, 191). Bu çalışmalarda beş yıllık sağ kalım ENE (-) negatif okkült metastatik hastada %71 iken, ENE (+) pozitif okkült metastatik hastada % 25' e düştüğü gösterilmiştir (190). Bir diğer çalışmada üç yıllık sağ kalım incelenmiş ve cerrahi ekstrakapsüler yayılım sonucu %90'dan %48'e gerilediği raporlanmıştır (191). Çalışma bulgularımıza göre, FUT-4 geninin ENE (+) pozitif hastalarda artmış olması, bu hastaların hem preoperatif tanı hem de postoperatif takiplerinde klinik uygulanabilirliği olan gelecek adına üzerine araştırılması gereken önemli bir bakış açısı kazandırdığını düşünmekteyiz. Hastalarımızın takip süresini uzatarak bu noktada literatürde daha önce değinilmemiş bir konuyu aydınatabileceğimize ümitliyiz. Böylelikle bu hastalarda gerek sağ kalım tayini gerekse ENE (+) pozitifliği nedeniyle oluşabilecek cerrahi işlem başarısızlığına FUT-4 geni üzerinden ek tedavi imkanları oluşturulabilecek potansiyel taşımaktadır.

6. Sonuç

Elde ettiğimiz bulgular, özellikle günümüzde hedefe yönelik hastalık mekanizması ile ilişkili olabilecek spesifik ve/veya sensitif olarak kullanılma ihtimali olan gerek hızlı ve erken teşhis gerek hastalığın durum takibi ve tedavi stratejilerinde izlenebilecek yeni ve etkin biyobelirteç seçeneklerinin olabileceğini göstermiş temel ve öncül bir çalışma niteliği taşımaktadır. Ek olarak, tümör mikroçevre odaklı çalışmaların artırılarak, karsinogenez sürecinin daha başlangıç aşamasında kontrol altına alınabilme ihtimali ile BBSCC tedavisi alan hastaların yaşam konforunu düşürmeden günlük işleyişine devam edebileceği öngörüsü ile literatüre katkı sağlayacak potansiyeli bulunmaktadır. Çalışma çıktılarıımıza göre, hasta sayısı ve anatomik lokasyon çeşitliği artırılarak, immün hücre gruplarının BBSCC'nin spesifik alt gruplarındaki mekanizması aydınlatılarak, hastalığın tedavisinde kişiye ve tümöre özgü yöntemlerin belirlenebilebilmesi ihtimali umut vericidir. Ayrıca çalışmamızın, potansiyel tümör mikroçevre belirteçlerinin invaziv/noninvaziv yöntemler kullanılarak erken tanıda faydalanılması için BBSCC üzerine yapılabilecek yeni araştırmalara perspektif kazandıracağı düşünülmektedir.



Kaynakça

- 1- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 2015;65:87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.
- 2- Lyratzopoulos G. Epidemiology: Cancer survival: global variation and long-term trends. Nat Rev Clin Oncol, 2015,12(4):191-192
- 3- Leemans, C.R., Braakhuis, B.J. and Brakenhoff, R.H. (2011) The molecular biology of head

and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 9–22, <https://doi.org/10.1038/nrc2982>

4- Hsu WL, Yu KJ, Chiang CJ, Chen TC, Wang CP. Head and neck cancer incidence trends in Taiwan, 1980_2014. *Int J Head Neck Sci.* (2017) 1:180–9. doi: 10.6696/IJHNS.2017.0103.05

5- Howlader N, Noone A, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2014. National Cancer Inst 2017 http://Seer.cancer.gov/Csr/1975_2014/.

6- Bin Liang, Ye Tao and Tianjiao Wang .Profiles of immune cell infiltration in head and neck squamous carcinoma. *Bioscience Reports* (2020) 40 BSR20192724. <https://doi.org/10.1042/BSR20192724>

7- Hui-Ching Wang, Leong-Perng Chan, and Shih-Feng Cho.Targeting the Immune Microenvironment in the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology* October 2019 | Volume 9 | Article 1084. doi: 10.3389/fonc.2019.01084

8- Xue, Y., Tong, L., LiuAnwei Liu, F., Liu, A., Zeng, S., Xiong, Q. et al. (2019) Tumorinfiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with prognosis in bladder cancer. *Oncol. Rep.* 42, 581–594, <https://doi.org/10.3892/or.2019.7196>

9- Mikhail Binnewies, Edward W. Roberts, Kelly Kersten. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine* | VOL 24 | MAY 2018 | 541–550 | <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>

10- Schneider, K., Marbaix, E., Bouzin, C., Hamoir, M., Mahy, P., Bol, V. et al. (2018) Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol.* 57, 1165–1172, <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1445287>

11- Cao, B., Wang, Q., Zhang, H., Zhu, G. and Lang, J. (2018) Two immune-enhanced molecular subtypes differ in inflammation, checkpoint signaling and outcome of advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 7, e1392427, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1392427>

12- Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer.* (2019) 18:63. doi: 10.1186/s12943-019-0983-5

13-McAllister, S.S. and Weinberg, R.A. (2014) The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat. Cell Biol.* 16, 717–727, <https://doi.org/10.1038/ncb3015>

14- Dionne, L.K., Driver, E.R. and Wang, X.J. (2015) Head and Neck Cancer Stem Cells: From Identification to Tumor Immune Network. *J. Dent. Res.* 94, 1524–1531, <https://doi.org/10.1177/0022034515599766>

15- Otolaringoloji, Baş ve Boyun Cerrahisi Kitabı. Op.Dr.Nihat Çakır. Nobel Tıp Kitabevi,

1996

- 16- Cummings CW, Flint PW, Harker LA, Haughey BH, Richardson MA, Robbins KT et al. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 4th ed. Mosby, Inc, Philadelphia 2005; 2: 1578-1617.
- 17- Koc C. Kulak burun boğaz hastalıkları ve baş-boyun cerrahisi: Guneş Tıp Kitabevleri; 2013.
- 18- Parkin DM, Laara E, Muri CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. Int J Cancer, 1988; 41 (2): 184-97.
- 19- Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2009;45:309---16.
- 20- Funk GF, Karnell LH, Robinson RA: Presentation, treatment and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base Report, Head Neck 2002; 24: 165-80.
- 21- Engin K, Erisen L (editör). Bas-boyun kanserleri. 1nci Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2003:235-70.
- 22- Alvi A, Myers EN, Johnson JT. Cancer of the head and neck, 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996: 321-60.
- 23- Howell RE, Wright BA, Dewar R. Trends in the incidence of oral cancer in Nova Scotia from 1983 to 1997. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2003;95 (2): 205-12.
- 24- Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. Oral Oncol 2005;41:244-260.
- 25- Baden E. Prevention of Cancer of the Oral Cavity and Pharynx. CA Cancer J Clin. 2008;
- 26- Siriwardena BS, Tilakaratne A, Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma 2006; 42 (8); 831-6
- 27- Baden E. Prevention of cancer of the oral cavity and pharynx. CA Cancer J Clin 1987; 37: 49-62.
- 28- Gluckman JL, Savoury WL. Carcinoma of the oral cavity. Otolaryngology, 3rd edition: 2041-67.
- 29- Field A, Longman L. Tyldesley's Oral Medicine. 5th ed. Oxford University Press Inc, New York, 2003;108-122.
30. Ju DMC. On the etiology of cancer of the lower lip. Plast Reconstr Surg. 1973;
31. Lee KJ (eds), Essential Otolaryngology: Head & Neck Surgery (9th ed), McGraw-Hill, USA 2012
- 32- Johnson J. Bailey's Head and Neck Surgery: Otolaryngology: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

33. Bray F, Ferlay J, Laversanne M, et al: Cancer Incidence in Five Continents: inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration, *Int J Cancer* 137(9):2060–2071, 2015.
34. Flint PW, Haughey BH, Niparko JK, Richardson MA, Lund VJ, Robbins KT, et al. Cummings Otolaryngology-Head and Neck Surgery E-Book: Head and Neck Surgery, 3-Volume Set: Elsevier Health Sciences; 7th Edition 2020.
35. A Mashberg 1 , P Boffetta, R Winkelman, L Garfinkel .. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans .*Cancer* . 1993 Aug 15;72(4):1369-75.
36. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, et al: Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), *Head Neck Oncol* 2(1):15, 2010.
37. Mallen-St Clair J, Alani M, Wang MB, Srivatsan ES: Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: the changing face of a disease, *Biochim Biophys Acta* 1866(2):141–150, 2016.
- 38- Mehanna H, Beech T, Nicholson T, et al: Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. Eisele DW, ed, *Head Neck* 35(5):747–755, 2013.
- 39-El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, et al, editors: WHO classification of head and neck tumours, (vol 9). ed 4, 2017.
- 40- Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Baş ve Boyun Cerrahisi. Prof. Dr. Muharrem GERÇEKER. Medikal Network Nobel Kitabevi. 2014
41. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*2018 Sep 12. PubMed PMID: 30207593. Epub 2018/09/13.
- 42.Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri yılılığı; sayfa 26, 2010.
43. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD.
44. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: Association by tumour type. *J Intern Med.* 2002. doi:10.1046/j.1365-2796.2002.01022.x.
45. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case–control study. *Cancer causes & control.*

2002;13(10):957-64.

46. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol*. 2010. doi:10.1097/PAP.0b013e3181f895c1.

47. Cattaruzza M, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology*. 1996;32(5):293-305.

48. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg a. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *Am J Gastroenterol*.2001. doi:10.1111/j.1572-0241.2001.03934.x.

49. Elci OC, Dosemeci M, Blair A. Occupation and the risk of laryngeal cancer in Turkey. *Scand J Work Environ Health* 2001; 27:233–39.

50-Hall SF, Groome PA, Irish J, et al: The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx, *Laryngoscope* 118:1362–1371, 2008.

51-Tuyns AJ, Esteve J, Raymond L, et al: Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva

52-Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, et al: Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India, *Int J Cancer* 121:1793–1798, 2007.

53-Jones RF: The Paterson-Brown-Kelly syndrome. Its relationship to iron deficiency and postcricoid carcinoma. II, *J Laryngol Otol* 75:529–561, 1961.

54- Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(2):122-37.

55-Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>.

56-Lyratzopoulos G. Epidemiology: Cancer survival: global variation and long-term trends. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015,12(4):191-192

57-Leemans, C.R., Braakhuis, B.J. and Brakenhoff, R.H. (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* 11, 9–22, <https://doi.org/10.1038/nrc2982>

58-Hsu WL, Yu KJ, Chiang CJ, Chen TC, Wang CP. Head and neck cancer incidence trends in Taiwan, 1980_2014. *Int J Head Neck Sci*. (2017) 1:180–9. doi: 10.6696/IJHNS.2017.0103.05

59-Howlader N, Noone A, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2014. National Cancer Inst 2017http://Seer.cancer.gov/Csr/1975_2014/.

- 60- Xue, Y., Tong, L., LiuAnwei Liu, F., Liu, A., Zeng, S., Xiong, Q. et al. (2019) Tumorinfiltrating M2 macrophages driven by specific genomic alterations are associated with prognosis in bladder cancer. *Oncol. Rep.* 42, 581–594, <https://doi.org/10.3892/or.2019.7196>
- 61-Schneider, K., Marbaix, E., Bouzin, C., Hamoir, M., Mahy, P., Bol, V. et al. (2018) Immune cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma and patient outcome: a retrospective study. *Acta Oncol.* 57, 1165–1172, <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1445287>
- 62- Cao, B., Wang, Q., Zhang, H., Zhu, G. and Lang, J. (2018) Two immune-enhanced molecular subtypes differ in inflammation, checkpoint signaling and outcome of advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* 7, e1392427, <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1392427>
- 63- Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer.* (2019) 18:63. doi: 10.1186/s12943-019-0983-5
- 64 -McAllister, S.S. and Weinberg, R.A. (2014) The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat. Cell Biol.* 16, 717–727, <https://doi.org/10.1038/ncb3015>
- 65- Dionne, L.K., Driver, E.R. and Wang, X.J. (2015) Head and Neck Cancer Stem Cells: From Identification to Tumor Immune Network. *J. Dent. Res.* 94, 1524–1531, <https://doi.org/10.1177/0022034515599766>
- 66- Spranger, S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *Int. Immunol.* 28, 383–391 (2016).
- 67- Evans, R. A. et al. Lack of immunoediting in murine pancreatic cancer reversed with neoantigen. *JCI Insight* 1, e88328 (2016).
- 68-Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C. H., Hammad, H. & Lambrecht, B. N. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol.* 33, 297–305 (2012).
- 69-Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–69.
- 70-Ireland LV, Mielgo A. Macrophages and fibroblasts, key players in cancer chemoresistance. *Front Cell Dev Biol* 2018;6:131.
- 71-Genard G, Wera A-C, Huart C, et al. Proton irradiation orchestrates macrophage reprogramming through NFκB signaling. *Cell Death Dis.* 2018;9:728.
- 72- Tan B, Shi X, Zhang J, et al. Inhibition of Rspo-Lgr4 facilitates checkpoint blockade therapy by switching macrophage polarization. [published online ahead of print July 2, 2018]. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0152>

- 73-Masoud Najafi, Nasser Hashemi Goradel, Bagher Farhood .Macrophage polarity in cancer: A review J Cell Biochem. 2019;120:2756-2765. DOI: 10.1002/jcb.27646
- 74-Tan B, Shi X, Zhang J, et al. Inhibition of Rspo-Lgr4 facilitates checkpoint blockade therapy by switching macrophage polarization. [published online ahead of print July 2, 2018]. Cancer Res. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0152>
- 75-Parayath NN, Parikh A, Amiji MM. Repolarization of tumor-associated macrophages in a genetically engineered non-small cell lung cancer model by intraperitoneal administration of hyaluronic acid-based nanoparticles encapsulating MicroRNA-125b. Nano Lett. 2018;18:3571-3579.
- 76-Bolei Lia, Min Rend, Xuedong Zhou, Qi Hana, Lei Chenga. Targeting tumor-associated macrophages in head and neck squamous cell Carcinoma Oral Oncology 106 (2020) 104723
- 77- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. Curr Opin Immunol 2010;22:231–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.009>.
- 78- Zhang Q, Liu L, Gong C, Shi H, Zeng Y, Wang X, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. PloS One 2012;7:e50946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050946>.
- 79-Hu Y, He M-Y, Zhu L-F, Yang C-C, Zhou M-L, Wang Q, et al. Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. J Exp Clin Cancer Res CR 2016;35:12. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0281-z>.
- 80- Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting tumor-associated macrophages in cancer. Trends Immunol 2019 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30890304>.
- 81- Diane Evrarda, Petr Szturzb, Annemiläi Tijeras-Raballandc, Lucile Astorgues-Xerric, Chloé Abitbola, Valérie Paradisd, Eric Raymonde, Sébastien Alberta, Béatrix Barrya, Sandrine Faivref. Macrophages in the microenvironment of head and neck cancer: potential targets for cancer therapy Oral Oncology 88 (2019) 29–38
- 82- Goswami KK, Ghosh T, Ghosh S, Sarkar M, Bose A, Baral R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. Cell Immunol 2017;316:1–10.
- 83- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature 2014;513:559–63 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043024>.
- 84- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. J Clin Invest. (2012) 122:787–95. doi: 10.1172/JCI59643

- 85- Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 2011;9:216. [https://doi.org/ 10.1186/1479-5876-9-216](https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-216).
- 86-Martin AW. Chapter 6 - Immunohistology of Non-Hodgkin Lymphoma. In: Dabbs DJ, editor. *Diagn. Immunohistochem*. Third Ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2011. p. 156–88. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5766-6.00010-8>.
- 87-Feng M, Jiang W, Kim BYS, Zhang CC, Fu Y-X, Weissman IL. Phagocytosis checkpoints as new targets for cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2019.
- 88-Albini A, Bruno A, Noonan DM, Mortara L. Contribution to tumor angiogenesis from innate immune Cells within the tumor microenvironment: implications for immunotherapy. *Front Immunol*. 2018;9:527.
- 89-Kim Y, Yoo JY, Lee TJ, et al. Complex role of NK cells in regulation of oncolytic virus–bortezomib therapy. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115:4927-4932.
- 90- Hsu J, Hodgins JJ, Marathe M, Nicolai CJ, Bourgeois-Daigneault MC, Trevino TN, et al. Contribution of nk cells to immunotherapy mediated by pd-1/pd-l1 blockade. *J Clin Invest* 2018;128:4654–68 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 30198904](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30198904).
- 91-Jiang C, Yuan F, Wang J, Wu L. Oral squamous cell carcinoma suppressed antitumor immunity through induction of pd-l1 expression on tumor-associated macrophages. *Immunobiology* 2017;222:651–7 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28017495>.
- 92-Quaranta V, Rainer C, Nielsen SR, Raymant ML, Ahmed MS, Engle DD, et al. Macrophage-derived granulins drives resistance to immune checkpoint inhibition in metastatic pancreatic cancer. *Cancer Res* 2018;78:4253–69.
- 93-Ruffell B, Chang-Strachan D, Chan V, Rosenbusch A, Ho CM, Pryer N, et al. Macrophage il-10 blocks cd8+ t cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing il-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* 2014;26:623–37.
- 94- Tıbbi Mıkrrobiyoloji ve İmmünoloji, by Warren Levinson, Dokuzuncu Baskı, Güneş Tıp Kitapevleri
- 95- Holling TM, Schooten E, van Den Elsen PJ. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol*. 2004;65(4):282-290.
- 96-Bushkin Y, Demaria S, Mohagheghpour N, le J. Activation of human CD8-positive T cells via the CD8/HLA class I complex. *Cell Immunol*. 1990;126(1):185-195.
- 97-Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531–64.

- 98- Shevach EM. Mechanisms of foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009;30(5):636–45.
- 99- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. (2010) 10:490–500. doi: 10.1038/nri2785
- 100-Regulatory/Suppressor T Cells in Health and Disease Ethan M. Shevach
- 101- Laura Strauss, Christoph Bergmann, William Gooding, Jonas T. Johnson, and Theresa L. Whiteside .The Frequency and Suppressor Function of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T Cells in the Circulation of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
- 102-Sadhna Aggarwal , Suresh C. Sharma , Satya N. Das. Dynamics of regulatory T cells (Tregs) in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*. 2017;1–11..DOI: 10.1002/jso.24782
- 103-Tumour infiltrating CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells (Tregs) relate to tumour grade and stromal inflammation in oral squamous cell carcinoma Dalal Al-Qahtani¹, Sukumaran Anil², Ravindranath Rajendran¹ *J Oral Pathol Med* (2011) 40: 636–642 doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01020.x
- 104- Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression—implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. (2019) 16:356–71. doi: 10.1038/s41571-019-0175-7
- 105-Shohei Hori , Shimon Sakaguchi . Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells *Microbes and Infection* 6 (2004) 745–751
- 106-Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, et al. Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(6):1733-1741.
- 107- Flammiger A, Weisbach L, Huland H, et al. High tissue density of FOXP3⁺ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2013;49:1273–1279.
- 108- Tan W, Zhang W, Strasner A, et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*. 2011;470:548–553.
- 109- Petersen, R. P. et al. Tumor infiltrating Foxp3⁺ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107, 2866–2872 (2006).
- 110-. Houghton AMG. The paradox of tumor-associated neutrophils. *Cell Cycle*. 2010;9:1732-1737.
- 111- Duo Zhang , Jian Zhou , Di Tang , Lin Zhou ,Liang Chou , Kuang-yen Chou , Lei Tao , Li-ming Lub. Neutrophil infiltration mediated by CXCL5 accumulation in the laryngeal squamous cell carcinoma microenvironment: A mechanism by which tumour cells escape

immune surveillance *Clinical Immunology* 175 (2017) 34–40

112-Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta:“N1” versus “N2” TAN. *Cancer cell*.(2009) 16:183–94.doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017

113- Xu Zhang, Wen Zhang, Xiao Yuan, Min Fu, Hui Qian and Wenrong Xu .Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review) *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 49: 857-867, 2016 DOI: 10.3892/ijo.2016.3616

114- Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Stephen TL, Ranganathan A, Deshpande C, Akimova T, Vachani A, Litzky L, Hancock WW, et al: Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J Clin Invest* 124: 5466-5480, 2014.

115- Riise RE, Bernson E, Aurelius J, Martner A, Pesce S, Della Chiesa M, Marcenaro E, Bylund J, Hellstrand K, Moretta L, et al: TLR-stimulated neutrophils instruct NK cells to trigger dendritic cell maturation and promote adaptive T cell responses. *J Immunol* 195: 1121-1128, 2015.

116- Wilson CL, Jurk D, Fullard N, Banks P, Page A, Luli S, Elsharkawy AM, Gieling RG, Chakraborty JB, Fox C, et al: NFκB1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 6: 6818, 2015.

117- H attar K, Franz K, Ludwig M, Sibelius U, Wilhelm J, Lohmeyer J, Savai R, Subtil FS, Dahlem G, Eul B, et al: Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: Enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer Immunol Immunother* 63: 1297-1306, 2014.

118- El Rayes T, Catena R, Lee S, Stawowczyk M, Joshi N, Fischbach C, Powell CA, Dannenberg AJ, Altorki NK, Gao D, et al: Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: 16000-16005, 2015.

119- Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, Verstegen NJ, Ciampricotti M, Hawinkels LJ, Jonkers J, et al: IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522: 345-348, 2015.

120-. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R and Ochoa AC: Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 69: 1553-1560, 2009.

121- Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, Huang XW, Wang Z, Chen EB, Fan J, Cao Y, Dai Z and Zhou

J: Tumor-associated neutrophils recruit macrophages and T-regulatory cells to promote progression of hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib. *Gastroenterology* S0016-5085(16)00231-6, 2016.

122-Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, et al. (2010) Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer* 129: 2183–2193.

123- Schoorl, R., Riviere, A. B., Borne, A. E. & Feltkamp-Vroom, T. M. Identification of T and B lymphocytes in human breast cancer with immunohistochemical techniques. *Am. J. Pathol.* 84, 529–544 (1976).

124- George V. Sharonov, Ekaterina O. Serebrovskaya , Diana V. Yuzhakova , Olga V. Britanova. B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour Microenvironment <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0257-x>

125- Axel Lechner, Hans A. Schlößer, Martin Thelen, Kerstin Wennhold, Sacha I. Rothschildh, Ramona Gillesi. Tumor-associated B cells and humoral immune response in head and neck squamous cell carcinoma *ONCOIMMUNOLOGY* 2019, VOL. 8, NO. 3, e1535293 (14 pages) <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1535293>

126- Pretscher D, Distel LV, Grabenbauer GG, Wittlinger M, Buettner M, Niedobitek G. Distribution of immune cells in head and neck cancer: CD8+ T-cells and CD20+ B-cells in metastatic lymph nodes are associated with favourable outcome in patients with oro- and hypopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:292. doi:10.1186/1471-2407-9-292.

127-Taylor T, Chrisikos, Yifan Zhoua, Natalie Slone. Molecular regulation of dendritic cell development and function in homeostasis, inflammation, and cancer Department Published in final edited form as: *Mol Immunol.* 2019 June ; 110: 24–39. doi:10.1016/j.molimm.2018.01.014.

128- Edwards AD, Chaussabel D, Tomlinson S, Schulz O, Sher A, Reis e Sousa C. 2003; Relationships among murine CD11c(high) dendritic cell subsets as revealed by baseline gene expression patterns. *J Immunol.* 171:47–60. [PubMed: 12816982]

129-Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. 2004; Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 199:9–26. [PubMed: 15233723]

130-Neefjes J, Jongasma ML, Paul P, Bakke O. 2011; Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 11:823–836. [PubMed: 22076556]

- 131-Durai V, Murphy KM. 2016; Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity*. 45:719–736. [PubMed: 27760337]
- 132-Idoyaga J, Fiorese C, Zbytnuik L, Lubkin A, Miller J, Malissen B, Mucida D, Merad M, Steinman RM. 2013; Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *The Journal of Clinical Investigation*. 123:844–854. [PubMed: 23298832]
- 132-Bell BD, Kitajima M, Larson RP, Stoklasek TA, Dang K, Sakamoto K, Wagner KU, Kaplan DH, Reizis B, Hennighausen L, Ziegler SF. 2013; The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat Immunol*. 14:364–371. [PubMed: 23435120]
- 133- McGovern N, Shin A, Low G, Low D, Duan K, Yao LJ, Msallam R, Low I. 2017; Human fetal dendritic cells promote prenatal T-cell immune suppression through arginase-2. *Nature*. 546:662–666. [PubMed: 28614294]
- 134- Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. 2007; Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*. 27:111–122. [PubMed: 17629517]
- 135-Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6:1755–1766
- 136- Hoffmann TK, Muller-Berghaus J, Ferris RL, Johnson JT (2002) Storkus W.J., Whiteside T.L. Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 8:1787–1793
- 137- Mary E. Keir, Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, and Arlene H. Sharpe. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity *Annu. Rev. Immunol.* 2008.26:677-704.
- 138- Chikuma S. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *Int J Clin Oncol* 2016;21:448–55.
- 139- Dan P. Zandberg , Scott E. Strome. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* 50 (2014) 627–632. 10.1016/j.oraloncology.2014.04.003
- 140- Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, et al. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.* 169:5538–45
- 141- Arlene H Sharpe, E John Wherry, Rafi Ahmed & Gordon J Freeman. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection *NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 8 NUMBER 3 MARCH 2007*
- 142- Brown, J.A. et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances

- T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* 170, 1257–1266 (2003).
- 143-Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 2015;27:450–61.
- 144- Amarnath S, Costanzo CM, Mariotti J, et al. Regulatory T cells and human myeloid dendritic cells promote tolerance via programmed death ligand-1. *PLoS Biol* 2010;8(2):e1000302.
- 145- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2009;206(13):3015–29.
- 146- Bianca Cioni , Ekaterina S. Jordanova , Erik Hooijberg . HLA class II expression on tumor cells and low numbers of tumor-associated macrophages predict clinical outcome in oropharyngeal cancer . DOI: 10.1002/hed.25442
- 147- Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, et al. Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(6):1733-1741.
- 148- Canhua Jianga, Fulai Yuana, Jie Wangb , Limeng Wu . Oral squamous cell carcinoma suppressed antitumor immunity through induction of PD-L1 expression on tumor-associated macrophages *Immunobiology* 222 (2017) 651–657
- 149- Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* 2016; 9:5023–39.
- 150- Lin, Y.M., Sung, W.W., Hsieh, M.J., Tsai, S.C., Lai, H.W., Yang, S.M., Shen, K.H., Chen, M.K., Lee, H., Yeh, K.T., Chen, C.J., 2015. High PD-L1 expression correlates with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 10,e0142656, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142656>.
- 151- Hsu MC, Hsiao JR, Chang KC, et al. Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol* 2010;23(10):1393–403.
- 152-Brahmer JR , Tykodi SS , Chow LQM , Hwu W-J , Topalian SL , Hwu P , et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer . *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 2455 – 65 .
- 153- Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C, Korman AJ, et al. 2007. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int. Immunol.* 19:1223–34
- 154- Villagómez-Ortíz VJ, Paz-Delgadillo DE, Marino-Martínez I, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and larynx.

- Cirugía y Cir (English Ed Published Online First: 2016. doi:10.1016/j.circen.2016.08.010
- 155- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* Published Online First: 2011. doi:10.3322/caac.20107
- 156- Wang J, Wang Y, Kong F, et al. Identification of a six-gene prognostic signature for oral squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol* Published Online First: 2020. doi:10.1002/jcp.29210
- 157- da Silva SD, Hier M, Mlynarek A, et al. Recurrent oral cancer: Current and emerging therapeutic approaches. *Front Pharmacol* Published Online First: 2012. doi:10.3389/fphar.2012.00149
- 158- Natasha Cohen, Stacey Fedewa, Amy Y. Chen, Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am* 30 (2018) 381–395 <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001>
- 159- Barış Karakullukçu, Kadri İla. The final resort treatment options of recurrent head and neck cancer. *Kulak Burun Bogaz İhtis Derg* 2017;27(1):56-64. doi: 10.5606/kbbihtisas.2017.85353
- 160- Goubran HA, Kotb RR, Stakiw J, et al. Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. *Cancer Growth Metastasis* Published Online First: 2014. doi:10.4137/cgm.s11285
- 161- Arneth B. Tumor microenvironment. *Med*. 2020. doi:10.3390/medicina56010015
- 162- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: Implications for new anticancer therapies. *J. Pathol*. 2002. doi:10.1002/path.1027
- 163- Kim J, Bae JS. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm*. 2016. doi:10.1155/2016/6058147
- 164- Etzerodt A, Tsalkitzi K, Maniecki M, et al. Specific targeting of CD163+ TAMs mobilizes inflammatory monocytes and promotes T cell-mediated tumor regression. *J Exp Med* Published Online First: 2019. doi:10.1084/jem.20182124
- 165- Li J, Mao X, Tian T, et al. Role of PFKFB3 and CD163 in Oral Squamous Cell Carcinoma Angiogenesis. *Curr Med Sci* Published Online First: 2019. doi:10.1007/s11596-019-2051-1
- 166- Maniecki MB, Etzerodt A, Uhløi BP, et al. Tumor-promoting macrophages induce the expression of the macrophage-specific receptor CD163 in malignant cells. *Int J Cancer* Published Online First: 2012. doi:10.1002/ijc.27506
- 167- Medrek C, Pontén F, Jirström K, et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* Published Online First: 2012. doi:10.1186/1471-2407-12-306

- 168- He KF, Zhang L, Huang CF, et al. CD163⁺ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* Published Online First: 2014. doi:10.1155/2014/838632
- 169- Liu JF, Wu L, Yang LL, et al. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *J Exp Clin Cancer Res* Published Online First: 2018. doi:10.1186/s13046-018-0713-7
- 170-Schwartz M, Zhang Y, Rosenblatt JD. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J. Immunother. Cancer*. 2016. doi:10.1186/s40425-016-0145-x
- 171- Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* Published Online First: 2010. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009
- 172- Kessel A, Haj T, Peri R, et al. Human CD19⁺CD25^{high} B regulatory cells suppress proliferation of CD4⁺ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev* Published Online First: 2012. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.018
- 173- Zhou X, Su YX, Lao XM, et al. CD19⁺IL-10⁺ regulatory B cells affect survival of tongue squamous cell carcinoma patients and induce resting CD4⁺ T cells to CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Oral Oncol* Published Online First: 2016. doi:10.1016/j.oraloncology.2015.11.003
- 174- Zhang Y, Morgan R, Chen C, et al. Mammary-tumor-educated b cells acquire lap/tgf- β and pd-l1 expression and suppress antitumor immune responses. *Int Immunol* Published Online First: 2016. doi:10.1093/intimm/dxw007
- 175- Oderup C, Cederbom L, Makowska A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* Published Online First: 2006. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02362.x
- 176- Fu C, Jiang A. Dendritic Cells and CD8 T Cell Immunity in Tumor Microenvironment. *Front. Immunol*. 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.03059
- 177- Hargadon KM. Tumor microenvironmental influences on dendritic cell and T cell function: A focus on clinically relevant immunologic and metabolic checkpoints. *Clin Transl Med* Published Online First: 2020. doi:10.1002/ctm2.37
- 178-Wu J, Wu H, An J, et al. Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* Published Online First: 2018. doi:10.1073/pnas.1805542115

- 179-Rojas K, Baliu-Piqué M, Manzano A, et al. In silico transcriptomic mapping of integrins and immune activation in Basal-like and HER2+ breast cancer. *Cell Oncol* Published Online First: 2021. doi:10.1007/s13402-020-00583-9
- 180- Zhang Y, Wang H. Integrin signalling and function in immune cells. *Immunology*. 2012. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03549.x
- 181- Wang Y, Xu B, Hu WW, et al. High expression of CD11c indicates favorable prognosis in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol* Published Online First: 2015. doi:10.3748/wjg.v21.i31.9403
- 182- Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, et al. Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* Published Online First: 2009. doi:10.1200/JCO.2008.18.9498
- 183- Li YW, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral neutrophils: A poor prognostic factor for hepatocellular carcinoma following resection. *J Hepatol* Published Online First: 2011. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.044
- 184- Rao HL, Chen JW, Li M, et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* Published Online First: 2012. doi:10.1371/journal.pone.0030806
- 185- Shen M, Hu P, Donskov F, et al. Tumor-associated neutrophils as a new prognostic factor in cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* Published Online First: 2014. doi:10.1371/journal.pone.0098259
- 186-Sheu BS, Sheu SM, Yang HB, et al. Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in babA2 genopositive infection. *Gut* Published Online First: 2003. doi:10.1136/gut.52.7.927
- 187- Wu CY, Huo JP, Zhang XK, et al. Loss of CD15 expression in clear cell renal cell carcinoma is correlated with worse prognosis in Chinese patients. *Jpn J Clin Oncol* Published Online First: 2017. doi:10.1093/jjco/hyx139
- 188-Elola MT, Capurro MI, Barrio MM, et al. Lewis x antigen mediates adhesion of human breast carcinoma cells to activated endothelium. Possible involvement of the endothelial scavenger receptor C-type lectin. *Breast Cancer Res Treat* Published Online First: 2007. doi:10.1007/s10549-006-9286-9
- 189-Walter D, Herrmann E, Winkelmann R, et al. Role of CD15 expression in dysplastic and neoplastic tissue of the bile duct – a potential novel tool for differential diagnosis of indeterminate biliary stricture. *Histopathology* Published Online First: 2016. doi:10.1111/his.13041

190- Joan Lop, Antoni Rigó, Alberto Codina. Prognostic Significance of Extranodal Extension in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma cN0 Patients With Occult Metastatic Neck Nodes . *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2018;69(3):156---164

191- Fumihiko Matsumoto, Taisuke Mori, Satoko Matsumura. Prognostic significance of surgical extranodal extension in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 1–6 doi: 10.1093/jjco/hyx055

