



**T. C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**KEMORADYOTERAPİ İLE TEDAVİ EDİLEN LOKAL İLERİ EVRE BAŞ BOYUN  
KANSERLİ OLGULARDA CK19, CK20, EGFR, SURVİVİN POZİTİFLİĞİNİN  
LOKAL KONTROL VE SAĞKALIMA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Esra KEKİLLİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa-2013**



**T.C.**  
**ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**KEMORADYOTERAPİ İLE TEDAVİ EDİLEN LOKAL İLERİ EVRE BAŞ BOYUN  
KANSERLİ OLGULARDA CK19, CK20, EGFR, SURVİVİN POZİTİFLİĞİNİN  
LOKAL KONTROL VE SAĞKALIMA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Esra KEKİLLİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Lütfi ÖZKAN**

**Bursa-2013**

## İÇİNDEKİLER

Özet .....	ii
İngilizce Özet .....	iv
Giriş .....	1
Genel Bilgiler .....	3
Lokal İleri Baş Boyun Kanserlerinde Tedavi Yöntemleri .....	3
Baş Boyun Kanserlerinde Prognostik Faktörler .....	6
Epidermal Growth Faktör Reseptör İnhibitörleri.....	11
Gereç ve Yöntem .....	13
Araç ve Gereçler.....	16
Yöntemler .....	17
Bulgular.....	21
Tartışma ve Sonuç.....	31
Kaynaklar .....	39
Teşekkür .....	46
Özgeçmiş.....	47

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı lokal ileri baş boyun kanseri (LİBBK) tanısıyla radyoterapi (RT) uygulanan olgularda, Epidermal Growth Faktör Reseptörü (EGFR), Sitokeratin19 (CK19), Sitokeratin20 (CK20) ve Survivin gen ekspresyonlarının, lokal kontrol (LK) ve genel sağkalıma (GS) etkisini değerlendirmektir.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalına LİBBK (EIII-EIV) tanısı ile başvuran, periferik kanında ve tümör dokusunda EGFR, CK19, CK20, Survivin gen ekspresyonları incelenen 26 olgu, sözü edilen genlerin LK ve sağkalımdaki rolünü belirlemek üzere irdelendi. Olguların 1'i tükrük bezi, 1'i hipofarenks, 2'si maksiler sinüs, 2'si orofarenks, 5'i nazofarenks, 5'i oral kavite ve 10'u larenks yerleşimliydi. RT başlamadan önce periferik kan örneklerinden ve parafinize edilmiş tümör dokularından total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA'lardan cDNA elde edilerek, Syber green boyama yöntemi ile EGFR, CK19, CK20 ve survivin genlerine ait ekspresyon düzeyleri belirlendi. Aynı işlem RT sonrası alınan periferik kanlarda tekrarlandı. EGFR, CK19, CK20 ve Survivin genlerinin birbirleriyle ilişkisi ve RT sonrası sağkalım üzerindeki etkisi pearson korelasyon yöntemiyle değerlendirildi.

RT öncesi ve sonrası EGFR, CK19 ve CK20 ekspresyonları birlikte ele alınarak değerlendirildiğinde RT öncesi CK19, CK20 veya EGFR pozitif olan olgularda, RT sonrasında da CK19 ya da CK20 pozitifliğinin devam ettiği gözlenirken, pearson korelasyon analizine göre survivininin RT öncesi ve sonrası ekspresyonunda da pozitif korelasyon saptandı.

Çalışmamızda LİBBK'li olgularda EGFR, CK19, CK20 ve Survivin ekspresyonu'nun LK ve GS üzerine anlamlı bir etkisi gösterilemezken bu genlerin herhangi birinde RT öncesi ekspresyon saptanan LİBBK olgularının diğer olgulara göre RT'den daha az yarar sağladığını öngörmekteyiz.

Çalışmamızın güvenilirliğini arttırmak için daha fazla olgu sayısı ile bulgularımızın ileri protein analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Lokal ileri evre baş boyun kanseri, EGFR, CK19, CK20, Survivin, Radyoterapi

## SUMMARY

### **Assesement of CK19, CK20, EGFR, and Survivin Positivity on Overall Survival and Local Control in Patients with Locally Advanced Head and Neck Carcinomas Treated with Chemo-radiotherapy**

In this study we aimed to investigate the effects of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Cytokeratin 19 (CK19), Cytokeratin 20 (CK20) and Survivin gene expressions on local control (LC) and overall survival (OS) in patients with local advanced head and neck cancer (LAHNC) who administered radiotherapy (RT).

26 patients who applied to Uludağ Universty Medical Faculty Department of Radiation Oncology with the diagnosis of LAHNC (SIII-SIV) were included in this study in order to determine the effects of EGFR, CK19, CK20 and survivin gene expressions on LC and OS by evaluating the mentioned gene expressions in tumor tissues and peripheral blood. Tumor were localized in salivary gland in 1 case, in hypopharynx in 1 case, in maxillary sinus in 2 cases, in oropharynx in 2 cases, in nasopharynx in 5 cases, in oral cavity in 5 cases and in larynx in 10 cases. RNA isolation was performed for paraffinized tumor tissues and peripheral blood samples prior to RT. cDNAs were obtained from total RNAs. EGFR, CK19, CK20 and survivin gene expression levels were determined via Syber green staining technique. The same procedures were performed to peripheral blood samples taken after RT. Pearson correlation test was used to determine the effects of EGFR, CK19, CK20, and survivin gene on survival after RT and to investigate their relationship within each other.

EGFR, CK19 and CK20 expression levels were evaluated both before and after RT. It was observed that CK19 and CK20 gene expressions still remained positive after RT in patients who were positive for CK19, CK20 and EGFR before the RT. A positive correlation was found with Pearson correlation test between survivin levels evaluated both before and after RT.

In our study, it was observed that EGFR, CK19, CK20 and survivin gene levels do not have a significant effect on LC and OS in patients with LAHNC. However we can assert that patients resulted as positive for any of gene expressions mentioned above before RT may have less benefits from RT compared to those who are negative. It is necessary to investigate our hypothesis on a larger patient population and confirm our findings with advanced protein analysis tests in order to increase the study confidence.

**Key words:** Local advanced head and neck cancer, EGFR, CK19, CK20, Survivin, Radiotherapy.

## GİRİŞ

Baş boyun kanserleri (BBK) önde dudaklar ve burun deliklerinden özefagus ve trakeaya kadar olan üst solunum ve sindirim yollarında yerleşen kanserlerin genel adıdır. Tüm kanserlerin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır ve tanı anında olguların %60'ı lokal ileri evrededir (1). Lokal ileri evre baş boyun kanserleri (LİBBK) tedavisinde birincil amaç sağkalımda artışı sağlamak ve beraberinde organ fonksiyonunu korumaktır. Rezektabl tümörlerin tedavisi cerrahi ve radyoterapi (RT) (ve/veya kemoterapi (KT)) iken, anrezektabl tümörlerin küratif kemoradyoterapidir. Genel olarak oral kavite ve paranasal sinüs kanserlerinde KT'ye duyarlılık oldukça azdır ve primer cerrahi ve/veya RT ile iyi fonksiyonel koruma sağlanabilmektedir (2). Sfenoid sinüs, nazofarenks, posterior farenks duvarı gibi rezeke edilemeyen veya cerrahisi yüksek oranda morbiditeye neden olabilecek olgularda küratif RT önceliklidir. Orofarenks, ileri evre larenks ve hipofarenks kanserinde de organ koruyucu yaklaşım sesi koruma ve yaşam kalitesi açısından kemoradyoterapi öncelikli olarak tercih edilmekte ve cerrahi, kurtarma tedavisine bırakılmaktadır (3). Erken evrede (EI, EII) olguların %60-95'inde yalnız lokal tedaviyle kür elde edilirken ileri evre hastalıkta kombinasyon tedavilerine rağmen olguların 2 yıllık lokal yineleme veya metastaz oranı %35-%55 arasındadır (4).

Aynı lokalizasyon, evre ve histopatolojik özelliklere sahip tümörlerde benzer tedavi uygulamasına karşın farklı sonuçlar alınması TNM sınıflamasının ve histolojik derecelendirmenin tedavi seçimi ve planlaması aşamasında yetersiz olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni aynı kategoride kabul edilen tümörlerin içinde tedaviye direnç gösteren ve henüz tanımlanmamış prediktif özelliklere sahip hücrelerin varlığı olabilir. Bu nedenle yeni tanı konmuş LİBBK'de tedavi stratejilerini belirlemede, prognozu saptamada ve takipte birtakım klinik ve laboratuvar parametrelerine ihtiyaç duyulmaktadır (5). Günümüzde pek çok tümör tipinde olduğu gibi BBK'de de radyoduyarlılık ve radyodirenci öngörmede kullanılabilecek genetik özelliklerin saptanması amacıyla pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar, biyomarkere göre hasta seçimi yapılabileceğine dair güçlü



kanıtlar vermekle beraber henüz LİBBK tanılı olgularda tedavi seçiminde kullanılacak etkin bir prediktif belirteç belirlenmemiştir. Güncel çalışmalarda Epidermal Growth Factor Reseptörü (EGFR), Survivin, Sitokeratin19 (CK19) ve 20 biomarkerlarının kandaki pozitifliğinin prognostik ve prediktif önemi araştırılmaktadır.

Yüksek EGFR ekspresyonunun LİBBK'de kötü prognoz ve iyonize radyasyonun da dahil olduğu sitotoksik ajanlara direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (5). LİBBK'de kemoradyoterapiye eklenen EGFR inhibitörleri ile sağ kalım oranlarında artış (6) bildirilirken, anti-EGFR tedavisine her hastanın aynı yanıtı vermemesi EGFR polimorfizmi ile ilişkilendirilmiştir (7). Survivin kaspaz bağımlı mekanizma yolu ile apoptozisin supresyonuna ve radyorezistansa sebep olur. Khan ve arkadaşları BBK'li olgularda Survivin'in yüksek ekspresyonunun cisplatin dirençliliğine neden olduğunu, Survivin'in potansiyel olarak RT'den fayda görecektir oral skuamöz hücre kanseri (OSHK) olgularının tanımlanmasında bir marker gibi kullanılabileceği bildirilmektedir (8). Başka bir biyobelirteç olan CK epitelyal hücrelerde eksprese edilir. CK19'un kanda pozitif olması nazofarenks kanseri mikro metastazlarıyla ilişkilendirilirken CK19 mRNA düzeyinin nazofarenks kanserinde evreyle orantılı olarak arttığı gösterilmiştir (9). CK20 mRNA varlığının da oral kanserlerin rekürrensinde yol gösterici bir marker olduğu bildirilmektedir. Toyoshima ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ileri evre OSHK'de CK20 ekspresyonunda artış saptamış, CK20'nin kandaki oranını tümörün çapı ile ilişkilendirmişlerdir (10).

Çalışmamızda LİBBK tanılı olgularımızda prediktif biyobelirteç olarak EGFR, Survivin, CK19 ve CK20'nin periferik kan ve tümör dokusunda lokal kontrol (LK) ve genel sağkalım (GS) üzerine etkisini ve prognoza katkısını değerlendirmeyi amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### LİBBK'lerinde Tedavi Yöntemleri

LİBBK'de en etkili tedavi yöntemleri cerrahi ve RT'dir. Bu tümörlerde RT, cerrahi öncesi neoadjuvan olarak, cerrahi sonrası adjuvan olarak kullanılabileceği gibi, olguların çoğunda küratif tedavi olarak kullanılmaktadır. KT genellikle palyasyon ya da adjuvan amaçlı kullanılır. Son zamanlarda ise organ koruyucu yaklaşım amacıyla ve RT'nin etkinliğini artırması nedeniyle birlikte uygulanmaktadır (11).

#### Cerrahi

Erken evre tümörde cerrahi tek başına küratif tedavi sağlarken, ileri evrede tek başına ya da postoperatif RT ile birlikte LK ve sağkalımı artırır. Radikal cerrahi; primer tümörün ve gizli veya belirgin boyun metastazlarının tedavisine olmak üzere iki bölgeye yöneliktir. Bu nedenle sıklıkla bu olguların cerrahi tedavisinde primer tümör rezeksiyonu ile birlikte çeşitli şekilde boyun diseksiyonları da eşlik eder. Genellikle kabul gören bir diğer görüş ise, eğer mümkünse primer tümör ile boyun diseksiyon materyalinin birlikte, aradaki lenfatik bağlantıları da içerecek şekilde en blok olarak çıkarılmasıdır. Baş boyun kanserli olgularda cerrahi uygulanmasının ikinci amacı kurtarma tedavisidir. Daha önceden RT ve/veya KT alıp, persiste veya rekürrens tümörü olan olgularda cerrahi, kurtarma tedavisi olarak da uygulanabilir. Bu amaçla uygulanan cerrahi tedavilerin başarı şansı primer cerrahi tedavi kadar yüksek olmamakla beraber morbiditesi, hatta mortalitesi yüksektir.

Palyatif cerrahi, diğer yöntemlerle tedavi edildiği halde kanseri kontrol altına alınamamış olgularda yutma ve solunumu kısmen düzeltmek, ağrı ve kanama kontrolünü sağlamak için uygulanır.

Cerrahi sırasında onkolojik hedeflerden ödün vermeden mümkün olduğunca cerrahi uygulanan organı ve fonksiyonlarını korumak, onkolojik nedenlerle korunamadığı durumda organı tekrar onarmak da cerrahi tedavinin hedefleri arasındadır (12).

### **Radyoterapi**

LİBBK'de RT'nin kullanılış şekli tümörün yerleşim yerine, operabl olup olmadığına, hasta komorbitesi ve tercihine, RT yapılacak merkezin olanaklarına bağlı olarak değişiklik gösterir.

### **Küratif Radyoterapi**

RT uygulanan hastalarda cerrahi girişimlerden kaçınılmış olması nedeniyle, cerrahi girişimin boyutuna bağlı olarak %1 ile %2 arasında değişebilen peroperatif mortalite olasılığı ekarte edilmiş olmaktadır. En önemli kazanç, hastalıktan etkilenen organların fonksiyonel bütünlüğünün bozulmaması ve herhangi bir kozmetik kaybın ortaya çıkmamasıdır. Tedavide RT'nin tek başına uygulandığı olgularda, hastalığın lokal veya bölgesel olarak tekrarlaması durumunda, cerrahi girişimler ile kurtarma tedavilerinin uygulanması sıklıkla mümkün olmaktadır. Buna karşın, başlangıçta cerrahi girişim uygulanan olgularda, hastalığın lokal ve bölgesel yayılımını sınırlayan anatomik bariyerlerin korunamaması nedeniyle, hastalığın lokal veya bölgesel olarak tekrarlaması durumunda kurtarma tedavisi olarak RT uygulamalarında başarı elde edilme şansı son derece düşük olmaktadır (13).

### **Preoperatif Radyoterapi**

RT uygulamasının preoperatif dönemde yapılmasındaki temel amaç hastalığın cerrahi sınırlarda tekrarlama olasılığının en aza indirilmesi, cerrahi girişim sırasında tümör ekiliminin önüne geçilmesi, lokal ve bölgesel subklinik hastalığın kontrol edilmesi ve teknik olarak cerrahi rezeksiyon şansı olmayan ya da sınırda olarak değerlendirilen durumlarda hastalığın cerrahi girişim uygulanabilir aşamaya getirilebilmesidir. Cerrahi girişimler, preoperatif RT tamamlandıktan sonra hastaliksız dokularda oluşacak olan radyasyon hasarının düzelmesinin ardından, mümkünse üç ile dört hafta içinde uygulanmalıdır. Preoperatif RT ile lokal ve bölgesel hastalık tekrarlamalarının ve uzak organ yayılımlarının sıklığının azaldığı saptanmıştır (14).

### **Postoperatif Radyoterapi**

Postoperatif RT uygulamalarında amaç lokal hastalık bölgesinde, bölgesel lenf nodlarında ve cerrahi sonrası rezidü tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması olmalıdır. Postoperatif RT dozları preoperatif RT uygulamaları ile

karşılaştırıldığında genellikle çok daha yüksek olmaktadır. Postoperatif RT lokal bölgesel hastalık riskini azaltır, fakat uzak metastaz riskini azaltmaz (14).

### **Kemoterapi**

KT kombine tedavi modalitesinin bir parçası olarak lokal bölgesel tedaviden önce (indüksiyon), RT ile eş zamanlı veya adjuvan olabilir.

### **Neoadjuvan Kemoterapi**

LİBBK'de organ koruyucu modalitenin bir parçası olan indüksiyon KT'sinde amaç, vaskülarizasyonu bozulmamış tümörde tümör volümünü daha hızlı küçültüp mikroskopik hastalığı eradike etmek, RT alanını küçülterek RT yan etkilerini azaltmaktır (15). İndüksiyon tedavi başarısı RT cevabının ve daha iyi prognozun öngörüsüdür. Küratif tedavi sağlamamasına karşın neoadjuvan KT ile LİBBK'de %20-50 tam yanıt oranı elde edilebilir. Klinik tam yanıt elde edilen olguların ise 2/3'ünde patolojik tam yanıt sağlanır. KT duyarlılığı primer tümörün yerleşim yeri, moleküler yapısı, diferansiyasyonuna bağlı olarak değişir. KT'ye yanıt alınmaması, tedavinin gecikmesi, akselere repopulasyonun etkisiyle tümör yükünün artması, geride dirençli klonların kalması dezavantajını beraberinde getirir. İndüksiyon tedavide cisplatin, 5-Fluorourosil, taxanlar kullanılmaktadır (16).

### **Eş Zamanlı Kemoradyoterapi**

Cerrahi sonrası yüksek risk faktörlerinin varlığında, inoperabl hastalıkta ve organ koruyucu tedavinin planlandığı LİBBK tedavisinde eş zamanlı kemoradyoterapi altın standarttır (17). Kemoradyoterapide amaç radyasyonun sitotoksik etkisini güçlendirerek radyoduyarlılığı, mikrometastazların kontrolü ile lokal ve sistemik etkinliği artırmaktır (18). Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) ve European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC)'in 2004 yılında yayınlanan randomize çalışmalarında (RTOG 95-01, EORTC 22931 çalışması) LİBBK'de cerrahi sonrası yüksek riskli olgu gruplarında adjuvan kemoradyoterapinin lokorejyonel kontrol ve hastaliksız sağkalımı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı gösterilmiştir. LİBBK'de kemoradyoterapinin tek başına RT'ye göre sağkalım ve LK avantajı sağladığı kanıtlanmıştır (19). Ancak eşzamanlı kullanımda özellikle ileri yaşlı olgularda artan toksisitenin tolere

edilebileceği kombinasyonlar önerilmelidir. Çok ajanlı kombinasyonların GS ve LK'de daha avantajlı olduğu bilinmektedir.

Cisplatin, 5-fluorourasil, Doseetaksel, Mitomisin C ve Metotreksat RT ile eş zamanlı kullanılabilen ajanlardır (20-22).

### **Adjuvan Kemoterapi**

LİBBK'de adjuvan KT uzak metastaz riskini azaltır. Adjuvan KT cerrahi sınır yakınlığı veya pozitifliği , iki ve üzerinde lenf nodu tutulumu olan, ekstrakapsüler nodal yayılım, perinöral-lenfatik-vasküler invazyon bulunan olgularda sağkalıma katkı sağlayabilir. Ancak RT'ye bağlı gelişecek fibrozis ve vasküler hasar nedeniyle dolaşım ve etkinlikte azalma, geride dirençli klonların kalması, tedavi toleransının düşmesi gibi nedenler adjuvan KT için dezavantaj oluşturabilir (23). Günümüzde LİBBK'lerinde sıklıkla uygulanan şema, Intergroup çalışmasındaki cisplatin 100 mg/m<sup>2</sup>, 1., 22. ve 43. günlerde şeklindedir (24)

## **Baş Boyun Kanserlerinde Prognostik Faktörler**

### **Klinik prognostik faktörler**

Baş boyun kanserinde en önemli prognostik faktör tanı anındaki tümör evresidir. Hipofarenks, larenks, nazofarenks, parotis tümörlerinin gençlerde ve kadınlarda daha iyi prognozda olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (25). Tümörün RT'ye cevabı, tedavi toleransı, kemoradyoterapiye karşı hastanın performansı da prognozu etkileyen hastaya bağlı faktörlerdir.

### **Patolojik prognostik faktörler**

Lenf nodu (LN) metastazı, perinöral invazyon, vasküler invazyon varlığı ve grade evreden sonra en önemli prognostik faktörlerdendir (26). BBK'de tutulan LN sayısının fazla olması, bilateral tutulum, alt boyun tutulumu, fikse nodlar, 6 cm'den büyük LN varlığı, ekstrakapsüler yayılımın olması ve cerrahi sınır pozitifliği lokal yineleme ve uzak metastaz olasılığını artırır (27). Oral kavite kanserinde invazyon derinliği ve tümör çapı LN tutulum riskini artırırken (28), yumuşak dokulara ve kemiğe invazyon prognozu olumsuz etkiler (29). Tükruk bezi kanserlerinde histolojik tipin bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Düşük grade'li kanserlerde

5 yıllık GS %80-90 iken adenoid kistik karsinom, yüksek grade'li mukoepidermoid karsinom, malign mikst tümörde GS %20'ye kadar düşer (30). Bununla beraber tükürük bezi kanserinde fasial sinir tutulumunun sonuçları olumsuz etkilediği bilinmektedir. Nazofarenks kanserinde prognozu en iyi olan grup keratinize SCC'dir. Lenfoepitelyomalarda GS ve LK oranları diğer histopatolojik tiplere göre daha iyi bulunmuştur. Nazofarenks kanserinin histolojik tipinin prognoza etkili olduğu çalışmalar mevcutsa da endemik bölgelerde prognozu belirlemede yetersiz kaldığı düşünülmektedir (31). Yapılan çalışmalarda nazofarenks kanserinde mastikatör boşluk ve tanı anında kranial sinir tutulumu da kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (32).

Hipofarenks kanserinde postkrikoid ve posterior farenks duvarı yerleşimli olanlar, piriform sinüs ve aryepiglottik fold tümörlerine göre daha kötü prognoz gösterirler. Larenks kanserinde ise yerleşim yerine göre glottik bölge tümörlerinde 5 yıllık sağkalım %80, supraglottik için %65, transglottik için %50, subglottik için %40 olarak saptanmıştır.

#### **Tedaviye bağlı prognostik faktörler**

BBK gibi radyoduyarlı tümörlerde RT sırasında verilen aranın ve tedaviye başlama zamanındaki uzamanın GS'ı olumsuz etkilediği gösterilirken, RT dozu, toplam RT süresi, RT tekniği tümör kontrolünde etkili tedaviyle ilişkili faktörlerdir (33,34). Eş zamanlı kemoradyoterapinin RT'ye göre LK ve GS'da daha etkili olduğu bilinmektedir.

#### **Moleküler prognostik faktörler**

EGFR ekspresyonunun LİBBK'de hastalısız sağkalım için bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilirken, oral kavite kanserinde EGFR ekspresyonu düşük sağkalımla ilişkili bulunmuştur (35,36). Survivin ekspresyonu larenks kanserinde klinik evre, T ve N evresi, histolojik grade ile; larenks kanseri ve oral skuamöz hücre kanseri (OSHK)'de ise lokal yineleme ve agresif seyirle ilişkili (37,38) bulunmuştur. CK19 ekspresyonu'nun lokal ileri evre OSHK'de yüksek grade, evre artışı, lokal yineleme ile orantılı olduğu ve düşük sağkalıma neden olduğu gösterilmiştir (39). İleri evre nazofarenks kanserli olgularda ise CK19 ekspresyonu yüksek saptanmıştır (9). İleri evre OSHK'de CK20 ekspresyonu tümörün çapı ile ilişkili

bulunmuştur (10). BBK'de TPA'nın (CK 8,18,19 kompleksi) tedavi boyunca ve sonrasında yüksek kaldığı olgularda kötü prognoz izlenmiştir (40).

Apopitotik marker olan p53 yüksek ekspresyonunun tükürük bezi tümörlerinde bağımsız prognostik faktör olduğu (41) ve Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) yüksekliğinin p53 ekspresyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (42). Benzer olarak orofarenks, hipofarenks ve larenks kanserinde de p53 mutasyonu lokal yineleme ve uzak metastazı artırırken, GS azaltır.

Her-2 neu overekspresyonu mukoepidermoid kanserlerin 1/3'ünde mevcut olup kötü prognozla ilişkilidir (43). RT öncesi ve sonrası ölçülen yüksek Anti-Epstein Barr Virus antikor titresini nazofarenks kanserinde kötü prognozla, bcl 2 koekspresyonu larenks kanserinde sağkalımda azalmayla beraber iken, EGFR, Cathepsin d, Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) aşırı ekspresyonu tümör progresyonu ile ilişkili bulunmuştur (44-46). Larenks kanserlerinde bir inflamasyon faktörü olan S-100 pozitif langerhans hücrelerinin stromada varlığının iyi prognostik özellik olduğu rapor edilmiştir (47). Özellikle orofarenks karsinomunda saptanan Human Papilloma Virüs DNA pozitifliği ise hem kemoradyoterapiye yanıtı hem de GS artırır (48).

## **Biyomoleküler markerlar**

### **EGFR**

EGFR epitelyal dokuda proliferasyon ve apoptozisi düzenleyen sinyallerin iletim yollarını kontrol eden hücre yüzey reseptörüdür. EGF, TGF gibi hücrenin dışından gelen sinyaller bu reseptörü aktive eder. EGFR ekspresyonunda artışa yol açan ana mekanizma EGFR gen amplifikasyonudur. Diğer mekanizma da, mutasyonlar sonucu EGFR'nin ligand bağlanmaksızın kendiliğinden aktive olmasıdır (49). BBK'de görülen en yaygın mutasyon genin yeniden düzenlenmesine veya alternatif mRNA bağlanmasına yol açan EGFR variant III (EGFRvIII) mutasyonudur (50). Çeşitli tümör tiplerinde EGFRvIII'ün radyorezistans ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (51,52). Ingeborg ve ark'ları EGFRvIII mutasyonu taşıyan BBK'li

olguların Setüksimab ve Docetaksel kombinasyon tedavilerinden daha az fayda gördüklerini belirtmişlerdir (53).

EGFR gen polimorfizmlerinin prognostik ve prediktif yönü pek çok çalışmada araştırılmaktadır. EGFR gen polimorfizmlerinin kemoradyoterapi direnciyle ilişkisi ve tedavi sonuçlarını nasıl etkilediği henüz netliğe kavuşmamıştır (54). Glioma'da (%40-50), meme kanserinde (%60), mesane (%23) ve kolorektal kanserde (%60-80), over kanserinde (%35-70), akciğerin skuamoz hücreli karsinomlarında (%40-80) ve skuamoz tip BBK'de (%95) hem EGFR hem de ligandlarının aşırı eksprese olduğu bunun da sağkalımla ilişkili sinyal yollarını aktive ederek tümörün progresyonuna ve uzak metastazda artışa yol açtığı bilinmektedir (55). EGFR ekspresyonunun kötü prognoz, azalmış sağkalım ve artmış metastaz riskiyle ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmişken, prediktif açıdan bakıldığında farklı sonuçlarla araştırılmaya açık bir konu olmaya devam etmektedir (56,57). Artmış EGFR ekspresyonu RT ve KT'nin indüklediği DNA hasarını tamir ederek KT ve RT'ye dirençte rol oynar (58). EGFR inhibitörlerinin tedaviye eklenmesi radyoduyarlaştırıcı etkiyi artırarak, DNA hasarının onarımını inhibe eder ve repopulasyonu azaltarak yerel tümör kontrolünü ve GS'ı artırabilir (58). Ang ve ark'nın yaptığı çalışmada EGFR ekspresyonu yüksek BBK'li olgulardan Continue Hiperfraksiyone Akselere Radiotherapy (CHART) ile tedavi edilenlerin prognozunun konvansiyonel kola göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir (4).

### **Survivin**

Survivin, normal dokuda ekspresyonu olmayan, tümörlü dokuda eksprese edilen, apoptoz inhibitör ailesinden bir proteindir (59). Kaspaza bağımlı hücre ölümünü bloke ederken proliferasyon ve damarlanma artışına sebep olur (60). Survivin hücre döngüsünde G2/M fazında bol miktarda eksprese olur. Küçük hücre dışı akciğer kanserinde (%83,5), kolorektal kanserde (%63,5), özefajial kanserlerde (%70,6), over kanserlerinde (%86), mide kanserlerinde (%34,5), meme kanserlerinde (%70,7), neuroblastomada (%47), hepatoselüler karsinomda (%60,5), endometrial karsinomlarda (%76) survivin ekspresyonu saptanmıştır. Survivin ekspresyonu bir çok çalışmada lokal yineleme, azalmış sağkalım, RT, KT ve hormonoterapi ajanlarıyla



tedavide direnç gelişimi ile ilişkili bulunurken, bilinenin aksine Freier ve ark'nın çalışmasında sadece RT ile tedavi edilmiş olgularda Survivin ekspresyonunun GS'ı artırdığı gösterilmiştir (61,62). Bu durum Survivin'in yol açtığı proliferatif aktivite ile radyasyonun etkilemiş olduğu tümör hücre sayısının fazlalığına bağlanmıştır.

### **Sitokeratin ( CK19/20 )**

Sitokeratinler kanser tanı ve izleminde kullanılan ara filaman proteinlerdir. CK20 hematolojik hücrelerde ve basit epitelde eksprese olurken CK19 hematolojik hücrelerde, basit epitelde ve skuamoz epitel hücreli kanserlerde anlamlı düzeyde yükseliş gösterir. CK'lerin sağlıklı bireylerde dolaşımdaki düzeylerinin düşük olması, kanserli olguların tedavi izlemi ve tedaviye cevabının değerlendirilmesinde, tümör progresyonunun ve metastazın erken saptanmasında fayda sağlar (63). CK19 ve 20, BBK'li, akciğer ve servikal kanserli olgularda tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde, akciğer, meme ve over kanserlerinde tümör yinelemesinin önceden tespitinde, mesane kanserinde tedavi modalitesinin seçiminde kullanılır (64). Meme kanserinde tamoksifene dirençli hücrelerde Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile saptanan CK20 ekspresyonunun artmış invazyon ve metastazla ilişkili olduğu gösterilmiştir (65).

### **Moleküler markerların Prediktif Etkileri**

Bir belirteç mevcut tedavide hedef molekülün kendisi olduğunda prediktif (tahmin edici) özellik taşır. Meme kanserinde Her-2 aşırı ekspresyonu olan olgular Lapatinib ve Transtuzumab tedavisinden fayda görebilirler (66). Pirker ve ark'ları EGFR ekspresyonu yüksek olan Küçük hücre dışı akciğer kanserli olgularda GS'ın düşük gruba göre daha iyi olduğunu göstermişlerdir (67). İleri evre Küçük hücre dışı akciğer kanserli olgularda EGFR ekspresyon düzeyi prediktif bir faktördür ve Setuksimabın fayda göreceği grubu öngörebilir. Günümüzde BBK'li olgularda EGFR hedefli tedavilere cevabı öngören biomarker henüz tanımlanmamıştır (68).

### **Baş Boyun Kanserlerinde EGFR inhibitörleri**

#### **Setüksimab**

Geleneksel KT ve RT yöntemleriyle elde edilen tedavi başarısızlığı ve tümör biyolojisinin anlaşılması diğer kanser türlerinde olduğu gibi BBK'de

de kanser hücrelerine özgü geliştirilen moleküler hedeflere yönelik tedaviyi zorunlu kılmaktadır. EGFR eksprese eden BBK'de 5 yıllık sağkalımın eksprese etmeyen gruba göre daha düşük bulunması EGFR'nin BBK'de hedeflenmesi gereken bir marker olduğunu göstermektedir (69,70). Setüksimab, tüm skuamöz kanserlerde bulunan EGFR ekstraselüler ligandına kompetitif olarak bağlanan IgG monoklonal antikorudur. İnsan baş boyun tümör hücre serilerinde EGFR monoklonal antikorları'nın doza bağımlı olarak hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (71). Kemoterapötik ilaçlarla birlikte uygulandığında en azından additif etki sağladıkları, RT ile birlikte uygulandıklarında da akselere repopülasyonun engellenmesi suretiyle radyoduyarlaştırıcı etki gösterdikleri belirtilmektedir. EGFR inhibitörleri hücre siklusunda G1 ve S safhalarında arrest oluşturup, anjiogenez inhibisyonu ile ve RT'ye bağlı DNA hasarının tamirini inhibe ederek radyoduyarlaştırıcı etki yaparlar. BBK'de EGFR inhibitörleriyle yapılan çalışmalar çelişkili sonuçlar vermektedir. Faz 3 bir çalışmada haftalık Setüksimab ile uygulanan RT, tek başına uygulanan küratif RT'ye göre LK ve GS artırmıştır (72). RTOG 0522 Faz III çalışmasının 2011 erken sonuçlarına göre ise kemoradyoterapi (akselere RT kullanılmış) ve Setüksimab ile tedavi edilen LİBBK'li olguların, sadece kemoradyoterapi alan kol ile karşılaştırıldığında progresyonsuz sağkalım ve GS oranlarında anlamlı bir artış raporlanmamıştır.

BBK'li olgularla yapılan faz 1 çalışmalarda, platin ajanları, 5-fluorourasil ve RT'ye eklenen Setüksimabın toksisiteyi arttırmadığı gösterilmiştir. Şiddetli akneiform döküntüler en sık görülen yan etkisidir. Setüksimab, 2009 National Comprehensive Cancer Network (NCCN) önerilerinde maxiller, etmoid sinüs, dudak, oral kavite, orofarenks, hipofarenks, glottik, supraglottik larenks ve unrezektabl nazofarenks kanserinde kombinasyon tedavisinde veya tek ajan olarak kullanılacak ajanlara eklenmiştir. Önerilen şema 400 mg/m<sup>2</sup> yükleme dozunu takiben, 250 mg/m<sup>2</sup> haftalık idame doz uygulaması şeklindedir.

Genetik ve Moleküler Biyolojideki gelişmeler her bir kanser olgusunun kendi içinde taşıdığı klinik ve moleküler ayrıntıları ortaya çıkararak klinisyenlere farklı tedavi yaklaşımları kazandırmakta ve takipte

kullandığımız parametrelerde çeşitliliği artırmaktadır. Biz de LİBBK'de tedavide yol gösterici olabileceğini ve takipte kullanılabilceğimizi düşündüğümüz biyobelirteçlerle bu yaklaşıma katkıda bulunabilmeyi hedefledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Ağustos 2010-Aralık 2011 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Muammer Ağım Radyoterapi Merkezi'ne başvuran ve lokal ileri evre (EIII- EIV) BBK tanısıyla kemoradyoterapi uygulanan 26 olgu, GS ve hastalısız sağ kalım üzerine etkili olabilecek kişisel, tümöral, hastalıkla ilişkili, tedaviyle ilişkili özellikler ve moleküler özellikler ele alınarak değerlendirildi.

Kişisel özelliklerden; yaş, cins, tümöral özelliklerden; evre, histolojik grade, histolojik tip, tümör çapı, lenf nodu durumu, tümör yerleşimi, perinöral invazyon, hastalığa ait özelliklerden; hastalık progresyonu, metastaz, tedaviye ait özellikler; RT sonrası KT alıp almaması, kurtarma cerrahi yapıp yapılmaması, eş zamanlı KT alıp almaması, moleküler özelliklerden EGFR, survivin, CK19 ve CK20'nin tümör dokusunda, RT öncesi ve sonrası kanda eksprese olup olmaması parametreleri incelendi. Kadın /erkek oranı 3/23, ortanca yaş 56,5 (38-75) yılı. Primer yerleşim yeri olarak olguların 16'sı (%61,5) Larenks dışı, (1'i tükrük bezi, 1'i hipofarenks, 2'si maksiler sinüs, 2'si orofarenks, 5'i nazofarenks, 5'i oral kavite), 10'u (%38,5) larenks yerleşimliyd. Histolojik olarak skuamoz hücre kanserli 19 (%73,1), adenoid kistik karsinom tanılı 2 (%7,7), undiferansiye karsinom tanılı 5 (%19,2) olgu vardı. Olguların 2'si (%2) grade 1, 11'i (%42,3) grade 2, 10'u grade 3 (%38,5) olup, çıkarılan örnekte materyal çok küçük olduğu için karsinoma insitu olarak raporlanan 1 (%3,8) olgu vardı. Evrelemede TNM evrelemesi kullanıldı. Olguların 2'si (%7,7) T2, 9'u (%34,6) T3, 14'ü (%53,8) T4 olup, olgulardan birinin T evresine mevcut kayıtlardan ulaşamadı. Nüks saptanan 2 olgu istatistik analizde T4 evresine dahil edildi. N0 olgu sayısı 10 (%38,5), N1 olgu sayısı 4 (%15,4), N2 olgu sayısı 10 (%38,5), N3 olgu sayısı 2 (%7,7) idi. Evre 3 olan 6 (%23,1), Evre 4 olan 20 (%76,9) olgu vardı. Olguların 10'u (%38,5) postoperatif, 16'sı küratif RT aldı. 7 olgu Neoadjuvan KT (Cisplatin, Docetaksel, 5-Fluorourosil, TPF kürü), 24 olgu eş zamanlı KT (Cisplatin 40 mg/m<sup>2</sup>, Cisplatin 25 mg/m<sup>2</sup>-Docetaksel 15 mg/m<sup>2</sup>, Cisplatin 75mg/m<sup>2</sup>-5-Fluorourosil, Setüksimab 250mg/m<sup>2</sup>, Taxoter 25mg/m<sup>2</sup>, Taxoter- Karboplatin)

aldı (Tablo-1). Çalışmaya dahil edilen olgulardan cerrahi sırasında alınarak, histolojik ve patolojik özellikleri değerlendirilmiş ve parafine gömülü olarak arşivlenmiş olan tümör ve normal doku örneklerinde EGFR, CK19 ve CK20 gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Tümör dokusunda EGFR, CK19, CK20'den aşırı eksprese olanların dışında normal eksprese olanlar da pozitif kabul edildi. RT başlangıcından önce ve RT bitiminden sonra üçüncü ayda periferik kanlarında RT-PCR'la bakılan EGFR, CK19 ve CK20 genlerinin ekspresyonları için sıfırın dışındaki herhangi bir değer pozitif kabul edilirken, survivin için 0,2' nin üzeri pozitif kabul edildi.

Çalışmaya dahil edilen olgular genetik çalışmalar ile ilgili açıklamaları içeren gönüllü olur formu ile bilgilendirildi. Çalışma için Uludağ Üniversitesi etik kurulundan 2011-3/1 sayı ve 20.12.2011 tarihli toplantıda onay alındı.

**Tablo-1:** Olguların demografik, klinik ve histopatolojik özellikleri

<b>Özellik</b>	<b>Sayı</b>	<b>(% değer)</b>	<b>Özellik</b>	<b>Sayı</b>	<b>(%değer)</b>
<b>Cinsiyet</b>			<b>T Evresi</b>		
Kadın	3	11,5	2	2	7,7
Erkek	23	88,5	3	9	34,6
<b>Yaş</b>			4	14	53,8
40 yaş üstü	25		Bilinmeyen	1	96,2
40 yaş altı	1		<b>N Evresi</b>		
<b>Primer tümör bölgesi</b>			0	10	38,5
Larenks	10	38,5	1	4	15,4
Larenks dışı	16	61,5	2	10	38,5
<b>Histopatolojik</b>			3	2	7,7
SCC	19	73,1	<b>Neoadjuvan Kemoterapi</b>		
Adenoid Kistik Ca	2	7,7	aldı	7	26,9
Undiff	5	19,2	almadı	2	7,7
<b>Perinöral invazyon</b>			bilinmiyor	17	65,4
Var	6	23,1	<b>Metastaz</b>		
Yok	4	15,4	Var	6	23,1
bilinmeyen	16	61,5	yok	20	76,9
<b>Lenfovasküler invazyon</b>			<b>RT sonrası Kemoterapi</b>		
Var	-		aldı	10	38,5
Yok	9	34,6	almadı	16	61,5
bilinmeyen	17	65,4	<b>Evre</b>		
<b>Ekstrakapsüler yayılım</b>			3	6	23,1
Var	-		4	20	76,9
Yok	9	34,6	<b>Hastalık Progresyonu</b>		
Bilinmeyen	17	65,4	Gelişti	6	23,1
<b>Grade</b>			Gelişmedi	20	76,9
İyi diff	2	7,7	<b>Kurtarma Cerrahisi</b>		
Orta diff	11	42,3	aldı	2	7,7
Az diff	10	38,5	almadı	24	92,3
Adenoid kistik Ca	2	7,7	<b>Tümör progresyonu</b>		
Bilinmeyen	1	3,8	Gelişti	7	26,9
<b>Tümör Çapı</b>			Gelişmedi	19	73,1
4 ün altı	3	11,5			
4 ün üstü	6	23,1			
Bilinmeyen	17	65,4			

RT: Radyoterapi T: Primer tümör N: Bölgesel lenf nodları,

## **Araç ve Gereçler**

### **Kullanılan Labarotuvur Cihazları**

- -86°C derin dondurucu (NUVE DF 490)
- -20°C derin dondurucu (ARÇELİK)
- -20°C derin dondurucu (BOSCH)
- +4 °C buzdolabı (INDESIT)
- +4 °C buzdolabı (ALASKA)
- Tissue lyser (QIAGEN)
- Nano Drop (THERMO)
- Soğutmalı santrifüj (HERMLE)
- UV kabin (BIOSAN)
- LC480II-RT-PCR (ROCHE)
- Termal Cyclers PCR (TECHNE)
- Vorteks (VELP SCIENTIFICA)

### **Kullanılan Kimyasallar- Kitler**

- Red Blood Cell Lyses Buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)
- BIOstic (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA)
- Rneasy FFPE Kit (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA)
- RT2 First Strand Kit (SABioscience)
- RT2 PCR Syber Green Master MiX (SABioscience)

## Yöntemler

### **TersTranskriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)**

Gen ekspresyonu için gereksinim duyulan miktarda dokuyu elde etmeyi amaçlayan yöntemdir. Moleküler biyolojide kullanılan bu yöntemle sonuçlar immunohistokimyasal yöntemlere kıyasla daha kısa zamanda, daha sensitif ve spesifik olarak alınabilmektedir. Temel mekanizma defalarca tekrarlanan enzimatik reaksiyonlarla DNA çoğalmasını sağlamaktır. Dolaşımdan veya tümör dokusundan izole edilen RNA molekülleri, ters transkriptaz enzimiyle komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülür. cDNA 'dan EGFR, CK19/20 ve Survivin geninin çoğaltılması amacıyla PCR reaksiyonları yaptırılır. Bu işlemde ısı düzenleyici bir araç (Thermocycler), kitler, kimyasal boyalar kullanılır. Optimizasyon için ek yöntemlere ihtiyaç duyulur (melting curve). Oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan ışımalar ve problemlerin verdiği sinyal, reaksiyon boyunca eş zamanlı (real-time) olarak kaydedilir ve bilinen standart oranlara kıyaslanarak ölçülebilen bir değer elde edilmeye çalışılır.

#### **1 . Parafine gömülü dokulardan RNA izolasyonu**

Hastalara ait parafine gömülü tümör ve normal dokuları, deparafinizasyon işlemi için BIOstic (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) ile muamele edildi. Daha sonra %100 etanol ile yıkama gerçekleştirildi. Parafini uzaklaştırılmış dokularda total RNA izolasyonu için Rneasy FFPE Kit (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA) kullanıldı.

#### **2. Kandan RNA izolasyonu**

Hastalara ait periferik kan örnekleri Red Blood Cell Lyses Buffer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) ile yıkanarak lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. Daha sonra, High Pure RNA İzolasyon Kit (Roche Diagnostics) kullanılarak lenfositlerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

#### **3. Total RNA'nın kalitesinin ölçümü**

Gerek periferik kandan gerekse parafine gömülü tümör ve normal dokularından elde edilen total RNA'ların yoğunluğu ve saflığı NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) ile ölçüldü.



OD260/OD280 deki optik dansitesi ~1,8 olan ve yoğunluğu 200-400 ng/μl olan RNA örnekleri seçilerek çalışma grubuna dahil edildi.

#### **4. cDNA sentezi**

Elde edilen RNA'lardan cDNA sentezi için RT2 First Strand Kit (SABioscience) kullanıldı. Her bir cDNA sentezi için 5 μg RNA kullanıldı. İki aşamada gerçekleştirilen cDNA sentezinin birinci aşamasında 2-8 μl RNA, 2 μl GE, 6-0 μL H<sub>2</sub>O'dan oluşan karışım otomatik ısı döngü cihazında 42°C'de 5 dakika tutulduktan sonra 1 dakika buzda bekletildi. İkinci aşamada 4 μl BC3, 1 μl P2, 2 μl RE3, 3 μl H<sub>2</sub>O karışımı ilk karışımın içine eklendi. 42°C'de 15 dakika, 95°C'de 5 dakika tutuldu. (Kısaltmalar; GE: 5X gDNA Elimination Buffer, BC3: 5X Ters Transkriptaz Buffer 3 H<sub>2</sub>O: Rnase-free H<sub>2</sub>O, P2: Primer and Eksternal Kontrol Karışım, RE3: Ters Transkriptaz Enzim Karışımı 3) Elde edilen cDNA'lardan EGFR, Survivin, CK19 ve CK20 için spesifik primerler kullanılarak hastaların periferik kan, tümör ve normal dokularındaki mRNA ekspresyon düzeyleri belirlendi. 1μl Primer, 12,5 μl RT2 PCR Syber Green Master MiX, 1μl cDNA, 10,5μl ddH<sub>2</sub>O'dan oluşan karışım 96 kuyulu yükleme plate'inde dağıtıldı. LC 480 cihazında gerçekleştirilen PCR'in denaturasyon aşamasında 95°C'de 10 dakika 1 döngü, amplifikasyon aşamasında 95°C'de (Her 72°C'de single floresan okuma yapıldı) 15 saniye 40 döngü, 60°C'de 1 dakika tutuldu. Erime eğrisinde 95°C'den 65°C'ye devamlı okuma yaptırıldı.

Tümör ve normal dokuların ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılmasında  $\Delta\Delta CT$  metodu kullanıldı. Bu metod tümör ve normal dokuların ekspresyon sonuçlarının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Böylelikle mRNA ekspresyonundaki değişimler oransal olarak belirlendi.

#### **Tedavi**

RT simülasyonu öncesi hastalar skopi altında supin pozisyonunda, baş altı köpüğü ve termoplastik maske ile sabitlenmişti. Oral kavite kanserli hastalarda dil stabilizasyonu için dil basacağı kullanılmıştı. Bilgisayarlı tomografide 3-5 mmlik kesitlerle alınan görüntüler bilgisayarlı RT planlama sistemine (CMS XIO bilgisayarlı planlama ünitesi) aktarılıp RT volümleri tanımlandıktan sonra yapılan sanal simülasyonu takiben elde edilen dijital radyoterapi alanları, konvansiyonel radyoterapi simülatöründe (Siemens

Mevasim-S) kontrol edilerek, termoplastik maske üzerine işaretlenmişti. Karşılıklı paralel alanlar 1,8-2Gy/fx dozunda 46 Gy'e dek 6 MV foton ışınlarıyla ışınlandıktan sonra medulla spinalis koruması yapılarak 50 Gy'e, koruma yapılan posterior boyun ise uygun enerjideki elektronla 50 Gy'e tamamlanmıştı. Definitif RT/Radyokemoterapide 50 Gy sonrası primer tümör ve çevresindeki 2 cm'lik alan 63-75 Gy'e dek çıkılıp, (postoperatif hastalarda total doz 60-67 Gy) tutulu lenf nodu yoksa boyun 50 Gyde bırakılmıştı. Tutulu lenf nodu <3 cm ise, tutulu lenf nodlarına ek doz (boost) verilerek 60-66 Gy'e tamamlanmıştı. Ön alan (supraklavikuler alan) 46 Gy'de kesilmişti.

### **İzlem ve Toksikite Değerlendirmesi**

Tedavi sonrası olgular ilk altı ay ayda bir, ikinci altı ay iki ayda bir endoskopik muayene ile izlenmişti. RT sırasında olgulara haftalık tam kan sayımı yaptırılırken izlemlerde RT'ye bağlı erken ve geç etkiler (RTOG/EORTC kriterlerine göre) kaydedilmişti

### **İstatiksel Değerlendirme**

Hastaya ait faktörler; cinsiyet, yaş, patolojik özellikler; evre, histolojik grade, histoloji, tümör çapı, lenf nodu durumu, tümör yerleşimi, perinöral invazyon olup olmaması, hastalığa ait faktörler; tümör progresyonu, hastalık progresyonu, metastaz, moleküler faktörler; EGFR, CK19/20, Survivin'in tedavi öncesi ve sonrası kandaki ekspresyon durumu, tümör dokusu ekspresyon analizleri, tedaviye ait özellikler; neoadjuvan, adjuvan ve eşzamanlı KT alıp almaması, kurtarma cerrahi yapılıp yapılmaması olarak değerlendirildi.

İstatiksel değerlendirmede SPSS16.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago,IL) istatistik paket programı kullanıldı. Sağkalım analizleri "medcalc" ve "Kaplan meier" istatistik programlarında değerlendirildi. Verinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılmayan veri için iki grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bağımlı örneklemelerin karşılaştırılmasında Wilcoxon işaret sıra testi kullanıldı. Markerların her birinin birbiriyle periferik kanda RT öncesi ekspresyonlarını karşılaştırmada, yine RT sonrası periferik kandaki ekspresyonlarını birbiriyle karşılaştırmada, her markerın RT öncesi ve RT sonrası ekspresyonlarını karşılaştırmada, tümör dokusu ile kan

değerleri arasındaki ekspresyonlarını karşılaştırmada Pearson korelasyon ve Spearman korelasyon katsayıları kullanıldı. Periferik kanda RT öncesi ve sonrasında sirküle gen ekspresyonlarının karşılaştırılmasında ve kategorik verinin incelenmesinde Fisher'in Kesin Ki-kare testi kullanıldı. Tek değişkenli analizlerde sağkalım analizi, "Kaplan-Meier" yöntemi kullanılarak "Log-rank" testi ile yapıldı. Çok değişkenli analizlerde genel sağkalımı ve hastalısız sağkalımı etkileyen prognostik faktörler ise Cox regresyon modeli ile belirlendi. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  kabul edildi.

## BULGULAR

Olguların ortanca izlem süresi 18 ay olup (3-26 ay) izlem süresi içinde 2'si larenks, 5'i larenks dışı yerleşimli yedi olguda (%26,9) primer tümörde progresyon, 2'si larenks, 4'ü larenks dışı yerleşimli (1 olgu maksiller sinüs, 3 olgu nazofarenks) altı olguda (%23,1) metastaz gelişmişti. Yineleme sonrası kurtarma tedavisi yapılan larenks tümörlü olguya total larenjektomi ve boyun diseksiyonu sonrasında ekstrakapsüler yayılım nedeniyle Cisplatin ve 5-Fluorourasil KT'si, oral kavite tümörlü diğer olguya ise total glossektomi uygulanmıştı. Takip sırasında 6 olgunun 1'inde (%23,1) kemik, 2'sinde akciğer, 4'ünde karaciğer metastazı gelişmişti. Karaciğer metastazı nedeniyle KT alan olgulardan birine metastazektomi, kemik metastazı gelişen diğer olguya 30 Gy palyatif RT uygulanmıştı. Olguların 26'sında RT öncesi alınan kanlardan gerçekleştirilen RT-PCR analizi sonucunda 6 olguda (%23,1), EGFR ekspresyonu, 4 olguda (%15,4) CK19 ekspresyonu, 1 olguda (%3,8) CK20 ekspresyonu, 1 olguda (%3,8) survivin ekspresyonu saptanırken, RT'den üç ay sonra EGFR ekspresyonu pozitif olan 1 (%3,8), CK19 ekspresyonu olan 3 (%11,5), CK20 ekspresyonu olan 4 (%15,4) olgu vardı. RT sonrası hiçbir olgunun periferik kanında Survivin ekspresyonu pozitif bulunmadı. Toplam 17 olguda tümör dokusunda ekspresyon analizi gerçekleştirilmiş olup, 5'inde (%19,2) EGFR ekspresyonu, 8'inde (%30,8) CK19 ekspresyonu, 1'inde (%3,8) CK20 ekspresyonu mevcuttu . Olgularda yaşın, cinsiyetin, T ve N evresinin, histolojik grade'in, histolojik tipin, tümör yerleşiminin, hastalık ve tümör progresyonunun, metastazın, neoadjuvan, eş zamanlı ve adjuvan KT alıp almamasının, kurtarma cerrahisi yapılıp yapılmamasının, EGFR, Survivin, CK19 ve 20 ekspresyonu ile ilişkisi Sperman korelasyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Klinik ve histolojik parametrelerle, RT öncesi, RT sonrası ve tümör dokusunda ölçülen EGFR, CK19, CK20, Survivin ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Veri sayısı az olduğu için kurtarma cerrahisi, eş zamanlı KT, tümör çapı ile ilgili parametrelerle kan ve tümör dokusunda bakılan markerlar arasında karşılaştırma yapılamadı. Larenks yerleşimli olgularda RT öncesi EGFR

ekspresyonu daha fazla gözlenirken (%50) ,larenks dışı yerleşimlilerde ise bu oran %6,3 olarak bulundu (p=0,018). Grade ile RT sonrası CK19 arasında orta düzeyde ilişki saptandı (p=0,012). Metastaz geliştiren her iki larenks kanserli olguda da CK19'un tümör dokusunda pozitif olduğu saptandı.

Pearson korelasyon analizine göre RT öncesi periferik kanda sirküle olarak bulunan genlerin ekspresyonlarının birbirleri ve tümör dokusundaki ekspresyonları arasında anlamlı bulguya rastlanmadı (Tablo 2-3).

**Tablo-2:** RT öncesi periferik kanda sirküle olarak bulunan genlerin ekspresyonları arasındaki korelasyon analizi

Korelasyon aranan genler	Pearson Korelasyon	p
EGFR ve CK19	-0,056	0,8
EGFR ve CK20	-0,047	0,83
EGFR ve Survivin	-0,067	0,76
CK19 ve CK20	-0,053	0,81
CK19 ve Survivin	-0,075	0,73
CK20 ve Survivin	-0,055	0,8

**CK19:** Sitokeratin19, **CK20:** Sitokeratin20, **EGFR:** Epidermal Growth Factor Reseptörü

**Tablo-3:** Sirküle genlerin radyoterapi öncesi periferik kanda ve tümör dokudaki ekspresyonları arasındaki korelasyon analizi

Korelasyon aranan genler		Pearson Korelasyon	p
RT öncesi periferik kan	Tümör doku		
EGFR	EGFR	-0,066	0,8
CK19	CK19	-0,096	0,713
CK20	CK20	.a	>0,0001
EGFR	CK19	-0,081	0,756
EGFR	CK20	-0,065	0,806
CK19	EGFR	-0,116	0,658
CK19	CK20	-0,076	0,771
CK20	CK19	.a	>0,0001
CK20	EGFR	.a	>0,0001

**CK19:** Sitokeratin19 **CK20:** Sitokeratin20 **EGFR:** Epidermal Growth Factor Reseptörü **RT:**Radyoterapi **a:** Değerlerden birisi değişmez olduğundan dolayı hesaplanamaz.

RT sonrası periferik kanda saptanan CK19 ve CK20 arasında korelasyon bulundu (p=0,049) (Tablo-4).

**Tablo-4:** RT sonrası periferik kanda sirküle olarak bulunan genlerin ekspresyonları arasındaki korelasyon analizi

Korelasyon aranan genler	Pearson Korelasyon	p
EGFR ve CK19	-0,061	0,776
EGFR ve CK20	-0,065	0,764
EGFR ve Survivin	-0,134	0,533
CK19 ve CK20	,407*	0,049
CK19 ve Survivin	-0,113	0,6
CK20 ve Survivin	0,04	0,853

**CK19:** Sitokeratin19 **CK20:** Sitokeratin20 **EGFR:** Epidermal Growth Factor Reseptörü

RT öncesi EGFR ekspresyonu ile RT sonrası EGFR ekspresyonu arasında sayı az olduğu için bir karşılaştırma yapılamamasına rağmen 5 olguda RT öncesi tümör dokusunda ekspresyon saptanan EGFR'nin RT sonrasında kanda saptanamadığı gözlemlendi ( $p=0,068$ ). RT öncesi ve RT sonrası kanda ölçülen Survivin düzeyleri arasında da anlamlılık mevcuttu ( $p=0,028$ ) (Tablo-5).

**Tablo-5:** RT öncesi ve RT sonrası kanda sirküle olarak bulunan genlerin ekspresyonları arasındaki korelasyon analizi.

Korelasyon aranan genler		Pearson Korelasyon	p
RT Öncesi	RT Sonrası		
EGFR	EGFR	-0,047	0,832
CK19	CK19	-0,074	0,73
CK20	CK20	0,048	0,823
<b>Survivin</b>	<b>Survivin</b>	<b>,432*</b>	<b>0,028</b>
EGFR	CK19	-0,066	0,764
EGFR	CK20	-0,07	0,751
EGFR	Survivin	0,06	0,787
CK19	EGFR	-0,042	0,844
CK19	CK20	-0,079	0,715
CK19	Survivin	-0,128	0,553
CK20	EGFR	-0,043	0,84
CK20	CK19	-0,061	0,776
CK20	Survivin	-0,195	0,361
Survivin	EGFR	-0,05	0,816
Survivin	CK19	-0,091	0,673
Survivin	CK20	-0,018	0,932

**CK19:** Sitokeratin19 **CK20:** Sitokeratin20 **EGFR:** Epidermal Growth Faktör Reseptörü **RT:** Radyoterapi



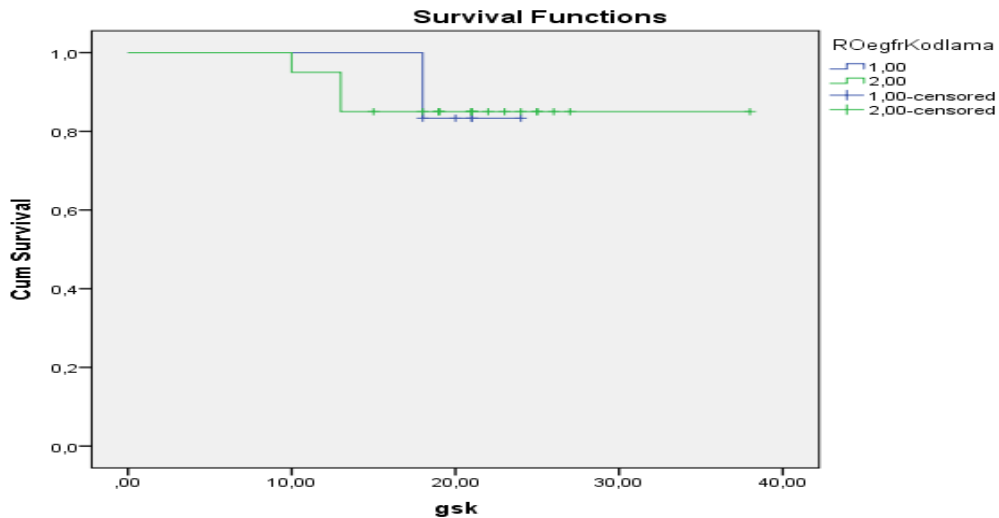
Fisher'in kesin testine göre CK19, CK20 veya EGFR pozitif olan olgular birlikte değerlendirildiğinde anlamlılık bulunmadı (Tablo-6).

**Tablo-6:** Periferik kanda radyoterapi öncesi ve sonrasında sirküle gen ekspresyonlarının karşılaştırılması

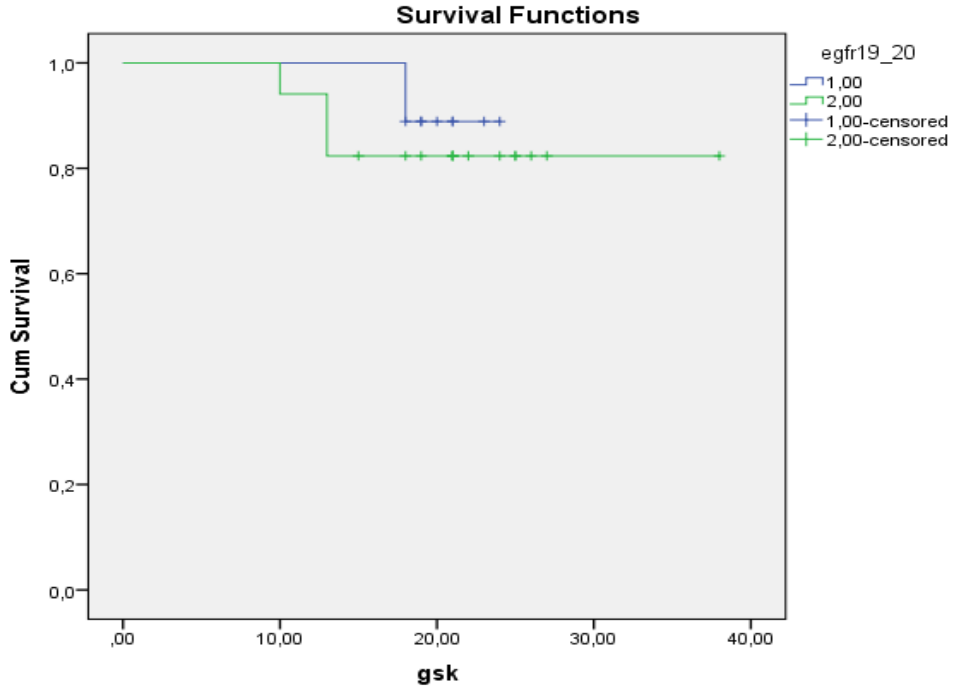
CK19, CK20 veya EGFR (+) olan olgu sayısı		İstatistiksel analiz	p
RT öncesi	RT sonrası		
2 (7,69 %)	7 (%26,9)	Fisher kesin Test	1

**CK19:** Sitokeratin19 **CK20:** Sitokeratin20 **EGFR:** Epidermal Growth Faktör Reseptörü **RT:** Radyoterapi

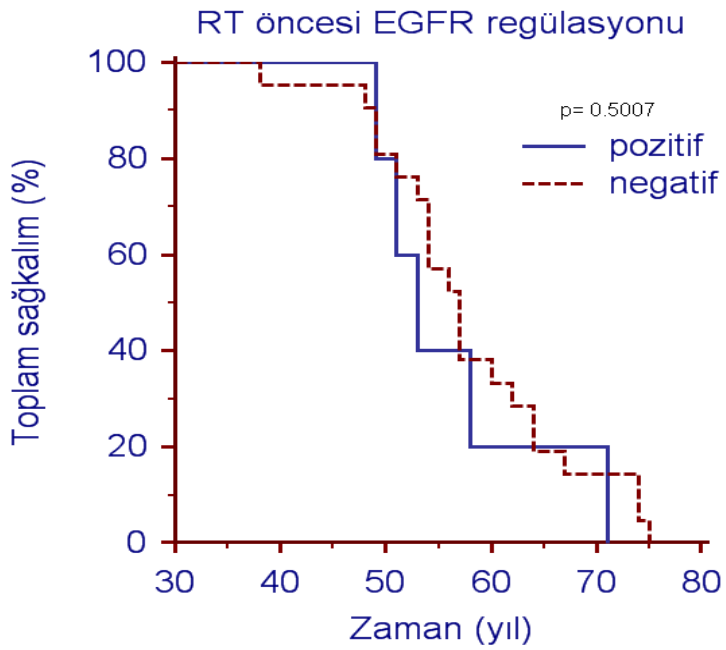
Log rank ve med calc istatistik analiz yöntemiyle değerlendirilen EGFR, CK19, CK20 ve Survivin'in kandaki ve tümör dokudaki pozitifliğinin GS üzerindeki etkileri istatistiksel anlamlı bir değere ulaşmadı (Şekil-1,2,3,4,5,6).



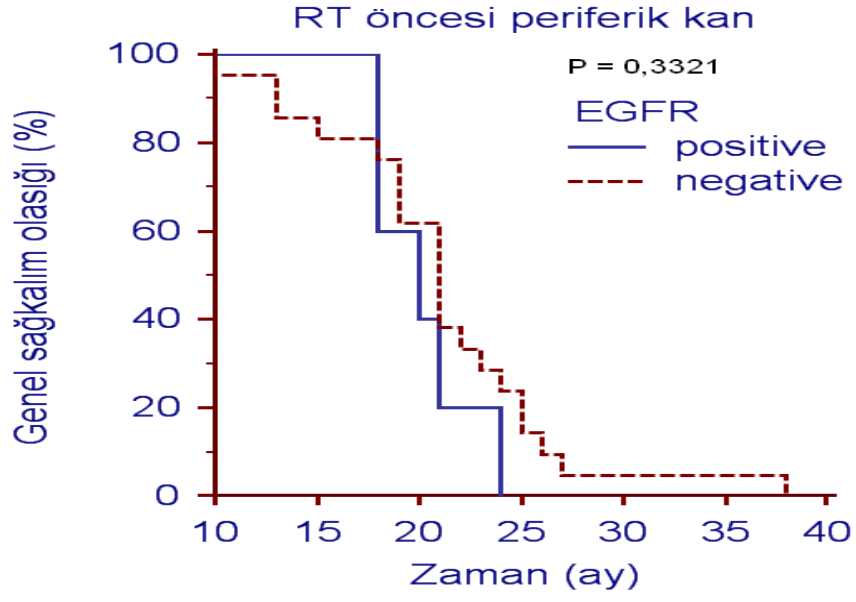
**Şekil 1:** RT öncesi Logrank Testi ile bakılan EGFR ile GS ilişkisi



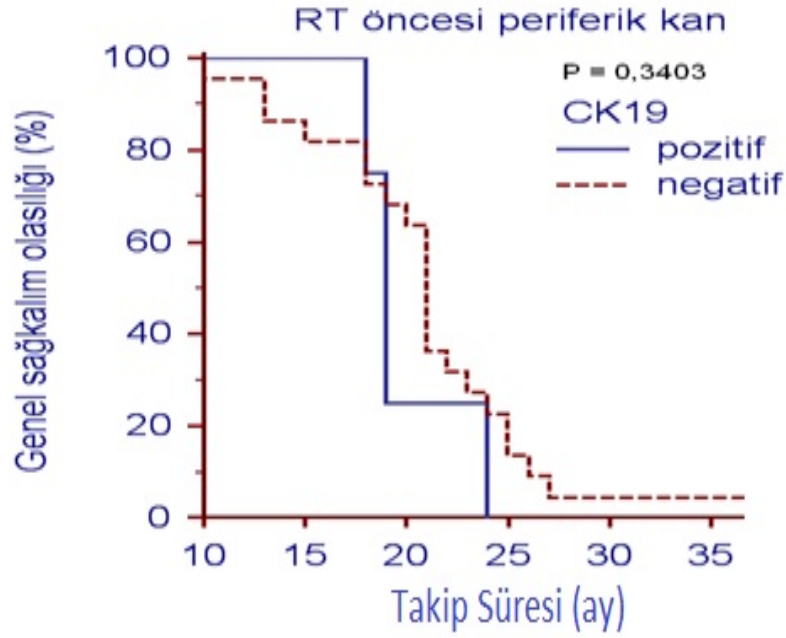
**Şekil 2:** RT öncesi Logrank Testi ile bakılan EGFR, CK19/20 ile GS ilişkisi



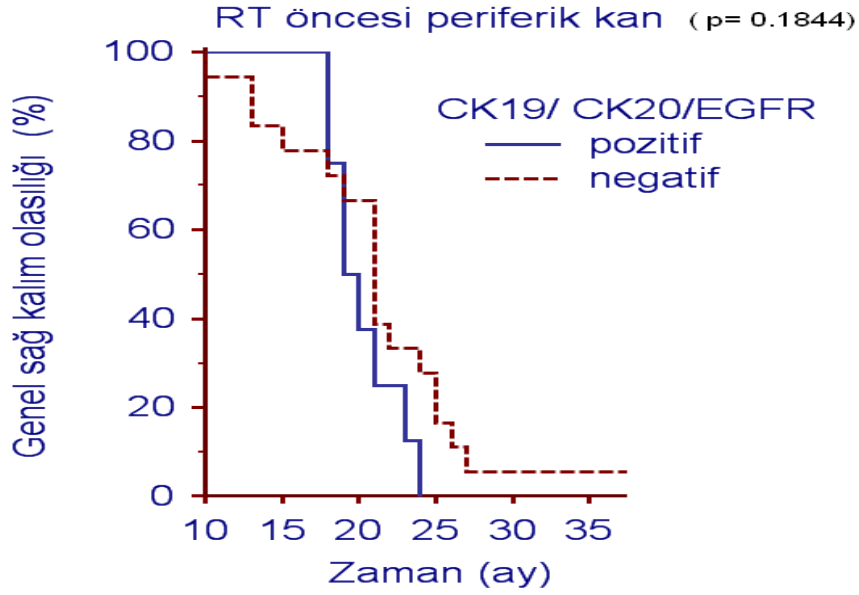
**Şekil-3:** RT öncesi Medcalc Analizi ile bakılan EGFR ile toplam sağkalım ilişkisi



**Şekil-4:** RT öncesi Medcalc Analizi ile bakılan EGFR ile GS ilişkisi



**Şekil-5:** RT öncesi Medcalc Analizi ile bakılan CK19 ile GS ilişkisi



**Şekil-6:** RT öncesi Medcalc Analizi ile bakılan EGFR, CK19, 20 ile GSK ilişkisi.

Değerlendirmenin yapıldığı Eylül 2012'de olgulardan 22'sinin (%84,6) hayatta olduğu ve 4'ünün (%15,4) kaybedildiği saptandı. Ortalama GS 19 ay (10-38), hastaliksız sağkalım 20 ay (3-24) olarak bulundu. Kaybedilen olguların hastalığa bağlı nedenlerle kaybedildiği belirlendi. Olguların üçünde 2. primer tümör olarak mesane, hodgkin lenfoma ve papiller tiroid kanseri mevcuttu. Papiller Tiroid kanserli olgunun tanısı ilkiyle aynı zamanda konmuştu.

GS ve hastaliksız sağkalımı etkileyebilecek klinik, patolojik ve moleküler ve tedaviyle ilişkili karakteristikler arasında yapılan değerlendirmede cinsiyet, grade, lenf nodu evresi (N), tümör çapı, tümör histolojisi, eş zamanlı KT alıp almama, kurtarma cerrahisi yapılıp yapılmaması, lenfovasküler invazyon, perinöral invazyon varlığı veya yokluğu gibi risk faktörleriyle ilişkili veri sayısı yetersiz olduğu için karşılaştırma yapılamadı. Evre (p=0,861), metastaz varlığı (p=0,112), T evresi (p=0,201), primer tümör yerleşim yeri (p=0,540), hastalık progresyonu geliştirip geliştirmeme (p=0,112) yönünden anlamlı fark saptanmadı. RT sonrası KT alanlarda GS etkilenmezken (p=0,083), larenks dışı yerleşimli olgulardan RT sonrası KT alanlarda hastaliksız sağkalımda anlamlı oranda artış gözlemlendi

( $p=0,013$ ) (24 aya 21 ay). Hastaliksız sağkalım ve GS etkileyen risk faktörleri Cox regresyon ile incelendiğinde anlamlı bir risk faktörü bulunamadı.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde LİBBK tedavisinde standart olarak kullanılan yöntem cerrahi, kemoradyoterapi ve/veya Setüksimab tedavisidir. İleri evre larenks ve hipofarenks kanserinde organ koruyucu yaklaşım yaşam kalitesi açısından öncelikli olarak tercih edilmekte ve cerrahi, kurtarma tedavisine bırakılmaktadır. Yüksek oranda larenks infiltrasyonu ya da kıkırdak invazyonu gibi cerrahi sonrası yüksek risk faktörlerinin varlığında, inoperabl hastalıkta ve organ koruyucu tedavinin planlandığı durumlarda eş zamanlı kemoradyoterapi altın standarttır (73,74). Setüksimab bir rekombinant kimerik anti-EGFR monoklonal antikorudur. Yineleyen ya da metastaz yapan LİBBK tedavisinde platin tabanlı KT ve 5-Fluorourasil ile kombine olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, platin tabanlı KT'nin başarısızlığında Setüksimab tek başına kimyasal ajan olarak verilebilmektedir (20).

Günümüzde uygulanan tedavi yöntemleri BBK hastalarının tedavisinde yetersiz kalmakta olup ortalama sağ kalım oranı %65 civarındadır (75). 5 yıllık GSK oranları larenks kanserinde %50-56 iken, nazofarenks kanserinde %35-57, hipofarenks kanserinde %24-%36, tükrük bezi karsinomlarında %27-47, paranasal sinüs tümörlerinde %27-40 arasında bildirilmiştir (76). Lokal ileri evre orofarenks karsinomlarında 2 yıllık SK %20-55 arasındadır. Lenf nodu tutulumu olmayan Retromalar trigon, sert damak, üst gingiva ve bukkal mukozanın ilerlemiş lezyonlarında küratif RT ile %80-90 LK sağlanırken, dil ön kısmı, ağız tabanının ilerlemiş lezyonlarında ise bu oran %65-70'dir.

BBK'nin yaşa göre görülme sıklığı, 5-7. dekatlar arasında yoğunlaşmaktadır. Cinsiyet açısından incelendiğinde kadın ve erkek arasında sağkalım açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla birlikte hipofarenks, larenks, nazofarenks, parotis tümörlerinin gençlerde ve kadınlarda daha iyi prognozda olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (25). Çalışmamızda cinsiyetin ve yaşın GS ve hastalısız sağkalım üzerine anlamlı etkisi saptanmadı.

Evre, lenf nodu metastazı, tümör çapı, perinöral invazyon, vasküler invazyon varlığı, yerleşim yeri, histolojik tip, grade gibi tümörle ilişkili faktörler LİBBK'li olgularda prognozu belirlemede önem taşır. Oral kavite kanserinde invazyon derinliği, tümör çapı lenf nodu yayılım riskine etki eder (28). Tükrük bezi kanserlerinde histolojik tipin bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Düşük grade'li kanserlerde 5 yıllık SK %80-90 iken adenoid kistik karsinom, yüksek grade'li mukoepidermoid karsinom, malign mikst tümörde %20'ye kadar düşer. Nazofarenks kanserinde prognozu en iyi olan grup keratinize SCC'dir. Nazofarenks kanserinde mastikatör boşluk ve tanı anında kranial sinir tutulumu da kötü prognozla ilişkili bulunmuştur (32). Hipofarenks kanserinde postkrikoid ve posterior farenks duvarı yerleşimli olanlar, piriform sinüs ve aryepiglottik fold tümörlerine göre daha kötü prognoz gösterirler. Larenks kanserinde ise yerleşim yerine göre glottik bölge tümörlerinde 5 yıllık sağkalım %80, supraglottik için %65, transglottik için %50, subglottik için %40 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda tümörle ilişkili faktörlerle GS ve hastalıksız sağkalım arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı.

Tedaviyle ilişkili faktörlerden RT dozu, toplam RT süresi, RT tekniği tümör kontrolünde önemli tedaviyle ilişkili faktörlerdir (34). Eş zamanlı KemoRT'nin RT'ye göre LK ve GS'da daha etkili olduğu bilinmektedir (21). Lokal ileri hastalıkta KT'nin RT'den önce veya sonra uygulanmasına kıyasla eşzamanlı verilmesi ile hem LK oranlarında artış, hem de sağ kalım avantajı gösterilmiştir. 2000 yılında yayınlanan Pignon meta-analizinde 5 yıllık sağ kalımda % 8 oranında artış bildirilmiştir. İndüksiyon KT'sini takiben kemoradyoterapi ve sadece kemoradyoterapiyi karşılaştıran randomize çalışmalar halen devam etmektedir. Çalışmamızda tedavi şekli ve KT kullanımı ile GS ve hastalıksız sağkalım arasında anlamlı bir ilişki gösterilemedi.

Aynı yerleşim yerine sahip olup aynı tedaviyi alan, aynı evredeki tümörlerde elde edilen farklı sonuçlar farklı prognostik özelliklere sahip alt grupların belirlenmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu amaçla LİBBK'de hastaya, tümöre ve uygulanan tedaviye ait prognostik faktörler tanımlanmakla birlikte bunların tedaviyi yönlendirmede yeterli olduğunu söylemek olanaksızdır.

Prognozu öngörmede kullanılabilir yeni prediktif etmenlerin bilinmesi uygun tedavi seçiminde yardımcı olabilecektir. Böylece RT'ye dirençli olabilecek olgular başlangıçta cerrahi tedaviye yönlendirilerek, tedavinin optimizasyonu ve gereksiz RT uygulamaları önlenebilecektir.

Uygulanan standart tedavi yöntemlerine cevap vermeyen olgular için alternatif yöntemlere duyulan ihtiyaçtan dolayı günümüzde gerçekleştirilen araştırmalarda sıklıkla moleküler yaklaşımlardan yararlanılmaya başlanmıştır (77,78). Setüksimab ile kombine edilmiş radyasyon tedavisinden sağlanacak yararda, Setüksimab'ın hedef proteini olan EGFR'nin tümör dokudaki ekspresyonunun önemi araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar EGFR proteininin BBK tümörlerinin yaklaşık %90'ında eksprese olduğunu göstermiştir (78). Ancak yaptığımız literatür araştırmasına göre Türk toplumunda BBK'li olgularda Setüksimab ile kombine radyasyon tedavisinden sağlanacak yararda belirleyici olan EGFR'nin tümör dokudaki ekspresyonunu araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca son dönemde gerçekleştirilen pek çok çalışmada çeşitli kanser türlerinde periferik kanda EGFR gen ekspresyon varlığının bir metastaz belirteci olabileceği ifade edilmektedir (63). Bununla birlikte, sirküle tümör hücreleri adı verilen periferik kanda dolaşan, metastatik özellikli tümör hücrelerinde CK19, CK20 ve survivin ekspresyonlarının yüksek olduğunu ifade eden çalışmalar mevcuttur (78). Ancak Türk toplumuna ait BBK'li olgularda EGFR, CK19, CK20 ve Survivin'in sirküle tümör hücrelerindeki ekspresyonunu araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. LİBBK olgularının RT öncesi alınarak parafinize edilmiş tümör ve normal dokularında ve RT öncesi ve sonrasında alınan periferik kanlarında, EGFR, CK19, CK20 ve Survivin gen ekspresyonlarının uygulanan RT 'den sağlanacak yarar üzerindeki etkisini araştırdık.

Günümüze kadar yapılan araştırmalarda EGFR'nin BBK'li olguların büyük bir çoğunluğunda yüksek derecede eksprese olduğu belirtilmiştir (36). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada 26 BBK olgusuna ait tümör dokuda EGFR ekspresyonu değerlendirilmiş ve beklenilenin aksine hastaların yalnızca %15,3'ünde bu genin ekspresyonu pozitif olarak belirlenmiştir. EGFR ekspresyonu gösteren olguların %75'i uygulanan tedaviden yarar sağlamıştır. EGFR ekspresyonu gözlenmeyen olguların ise %54'ü tedaviden yarar



sağlayabilmiş, %45'i ise tedaviden yarar sağlayamamıştır. Çalışma grubumuza dahil edilen olgularda EGFR ekspresyonunun yüksek oranda görülememesi ve EGFR ekspresyonu negatif olan olguların tedaviye verdikleri cevapların birbirinden farklı olması, bazı olguların tümör dokularında EGFR mutasyonu taşıyor olabileceğini düşündürmektedir. LIBBK olgularında EGFR ekspresyonunun Setüksimab ve kemoterapötik ajanlarla kombine edilmiş RT'ye verecekleri cevapla ilgili istatistiksel olarak anlamlı bir bulguya sahip olunabilmesi için çalışmaya dahil edilen vaka sayısı arttırılmalı ve EGFR gen ekspresyonu negatif olan olgularda, RT ve ilaç dirençliliğine yol açtığı bilinen EGFR gen mutasyonlarının varlığı araştırılmalıdır.

RT öncesi ve sonrasında periferik kandan gerçekleştirdiğimiz EGFR ekspresyon analizi sonucunda ise olguların %18,5'inin periferik kanında EGFR ekspresyonu gözlenirken, RT sonrası olguların hiçbirinde EGFR ekspresyonu gözlenmemiştir. Bu nedenle, yalnızca EGFR gen ekspresyonu göz önünde bulundurularak RT'nin metastaz potansiyeli üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, EGFR pozitif olan olgu sayımızın azlığından dolayı istatistiksel bir analiz yapılamamış olmasına rağmen, periferik kanında EGFR ekspresyonu yüksek olan olguların RT sonrası metastaz potansiyelinin azalacağı düşünülebilir. Ancak, EGFR geni ekspresyonu periferik kanda bir metastaz belirteci olarak değerlendirilmesi gereken tek parametre değildir. Bu nedenle RT'nin BBK'li olgulardaki metastaz potansiyeli üzerindeki etkisinin daha doğru şekilde ortaya konabilmesi için diğer metastaz belirteçleri olan periferik kanda sirküle olarak dolaşan tümör belirteçlerinin RT öncesi ve sonrasındaki ekspresyon analizlerinden elde ettiğimiz veriler, EGFR gen ekspresyonu analizlerinden elde ettiğimiz bulgular ile birlikte ele alınarak değerlendirildi.

CK gen ailesi epitelyal hücrelerde eksprese olan bir tümör belirteci grubudur. Bu genlerin pek çok kanser türünde periferik kandaki ekspresyonu hastalığın metastatik potansiyeline işaret etmektedir (63). Bu gen ailesine mensup bir ara filaman proteini olan CK19'un gen ekspresyonu, meme ve kolon kanseri gibi hastalıklarda periferik kanda sirküle tümör hücresi taramasında bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (79,80). BBK

hastalarında CK19 gen ekspresyonunun varlığını araştıran günümüze kadar üç çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan ikisinde CK19 varlığı kemik iliği hücrelerinde araştırılmıştır. Wollanberg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada olguların %30.7'sinde kemik iliğinde CK19 gen ekspresyonu saptamışlardır ve bu pozitifliğin hastalığın nüksü ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (81). Andratschke ve arkadaşları ise CK19 ekspresyonu pozitif olan kemik iliği örneklerinde MHC1 antijeninin ekspresyonunun nadir görülen kemik metastazlarına yol açabileceğini ifade etmişlerdir (82). Zhong ve arkadaşlarının lokal ileri evre oral skuamoz hücreli olgularda saptadıkları CK19 ekspresyonunun tümör yinelemesi ve düşük sağkalımla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (39). Çalışmamızda değerlerlendirilen 26 olgunun %15.3'ünde RT öncesi periferik kanda CK19 ekspresyonu gözlenmiştir. RT sonrası alınan periferik kandan gerçekleştirilen gen ekspresyonu analizi sonucunda ise bu olguların tamamında CK19 ekspresyonunun down-regüle olmuştur. Ayrıca çalışmamızda anlamlılık taşımamakla birlikte metastaz geliştiren Larenks kanserli iki olgunun ikisinde de tümör dokusunda CK19 pozitifliği saptanmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre RT'nin periferik kandaki CK19 ekspresyonunu inhibe edebileceğini ,larenks kanserli olgularda CK19 pozitifliğinin metastaz gelişimi açısından incelenebileceğini ancak istatistiksel olarak anlamlı veri elde edebilmemiz için çalışmamıza dahil edilen olgu sayısını arttırmamız gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız kapsamında hastaların periferik kanında değerlendirdiğimiz ikinci sirküle tümör hücre belirteci de sitokeratin ailesinin diğer bir üyesi olan CK20'dir. CK20'de tıpkı CK19 gibi bir ara filaman proteindir ve sağlıklı bireylerin periferik kanında eksprese olmaz (83,84). Periferik kanlarında CK20 ekspresyonu gözlenen gastrointestinal kanser olgularının CK20 ekspresyonu gözlenmeyenlere göre daha kötü prognoza sahip oldukları belirlenmiştir (83,84). CK20'nin çoğunlukla gastrik ve intestinal epitelde, ürotelyumda ve Merkel hücrelerinde ekspresyon gösterdiği bilinmektedir. Son dönemde Tunca ve arkadaşları tarafından, Türk populasyonunda meme kanserli olgularla yapılan bir çalışmada periferik kandan CK20 ekspresyonunun meme kanserinde de metastaz ve nüks ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (63). Mevcut çalışma, BBK'li olguların

periferik kanında bir metastaz belirteci olarak CK20 ekspresyonunun araştırıldığı ilk çalışmadır. Ayrıca RT'nin CK20 ekspresyonu üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bulgularımıza göre, olgularımızın %3,8'inde tedavi öncesi periferik kanlarında CK20 ekspresyonu pozitif olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu olguların RT sonrasındaki periferik kanlarında CK20 ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bir metastaz belirteci olarak CK20 gen ekspresyonunun RT ile inhibe edilemediği düşünülmektedir. Ayrıca, RT öncesi ve RT sonrası periferik kanlarındaki EGFR, CK19 ve CK20 ekspresyonları birlikte ele alınarak değerlendirildiğinde, gerçekleştirilen Pearson korelasyon analizine göre, hastalarda RT sonrasında gözlenen CK19 pozitifliği ile CK20 pozitifliği korelasyon göstermektedir ( $p=0,049$ ). Buna göre, RT öncesinde tümör dokusunda ya da periferik kanında CK19, CK20 veya EGFR pozitifliği gözlenen olgular RT alsalar dahi kanlarında CK19 ya da CK20 pozitifliği devam edebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ekspresyonu değerlendirilen diğer bir gen olan Survivin'in BBK de dahil olmak üzere bir çok kanser türünde yüksek düzeyde ekspresyon gösteren, tümörün agresifliği ve ilaç dirençliliği ile ilişkili olan bir anti-apoptotik gen olduğu bilinmektedir. 2012 yılında Khan ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada Survivin'in Cisplatin tedavisi ile olan ilişkisi araştırılmış ve bu genin yüksek ekspresyonunun, Cisplatin tedavisinde dirence yol açtığı ortaya konmuştur (8). Bununla birlikte, yüksek Survivin ekspresyonunun BBK olgularında RT direncine yol açtığı bildirilmiştir (85). Zhu ve arkadaşları, immunohistokimyasal boyama yönteminden yararlanarak, olguların biyopsi örnekleri üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarında tümör dokuların % 60,8'inde Survivin ekspresyonunu yüksek oranda gözlemlemişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada Survivin ekspresyonu, metastaz ve klinik evrenin, olguların GSK ile korelasyon gösterdiği ve Survivin ekspresyonu yüksek olan tümörlerin RT'ye verdikleri cevabın düşük olduğu belirtilmiştir (85). Bu verilerin yanı sıra, 42 farklı BBK hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada apoptozis ile ilişkili olduğu bilinen 70 farklı proteinin RT ile olan ilişkisi ELİSA yönteminden yararlanarak araştırılmış bu proteinler arasında yalnızca Survivin'in BBK'lerinde RT

hassasiyeti konusunda belirteç olabilecek potansiyele sahip olduğu saptanmıştır (86). Bu olguların Paklitaksel ve Oksaliptin ile kombine edilmiş radyasyon tedavisinden yarar sağlayabileceklerini ifade eden çalışmalar mevcuttur (87). Ancak, bahsi geçen çalışmaların hepsi BBK'li olguların tümör dokularında gerçekleştirilmiş çalışmalardır ve bir metastaz belirteci olan Survivin'in RT öncesi ve sonrasında periferik kanda görülme oranlarının araştırıldığı bir çalışma literatürde henüz bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda BBK olgularında RT öncesi ve sonrasındaki Survivin gen ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda elde edilen bulgular, daha önce tümör dokuda gerçekleştirilen çalışmaların bulguları ile paralellik göstermektedir. Bulgularımıza göre RT öncesi periferik kanda gözlenen Survivin ekspresyonunun RT sonrası gözlenen survivin geni ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği belirlenmiştir ( $p= 0,028$ ). Bu bulgular bize, periferik kanında yüksek Survivin ekspresyonu gösteren olguların RT'ye direnç gösterebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca RT sonrasında periferik kanında Survivin ekspresyonu yüksek olan olguların metastatik potansiyelinin devam ediyor olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızın güvenilirliğinin artırılabilmesi için vaka sayısının artırılması ve bulgularımızın ileri protein analizleri ile desteklenmesi gerekmektedir, gerçekleştirdiğimiz literatür araştırması ve şu ana kadar elde ettiğimiz veriler ışığında periferik kanında EGFR, CK19, CK20 veya Survivin gen ekspresyonlarından birisinde pozitiflik olan BBK olgularının diğer hastalara göre RT'den daha az yarar sağlıyor olabileceklerini öngörmekteyiz. Bununla birlikte, literatürde, çalışmamızda değerlendirilmiş olan EGFR, CK19 ve CK20'nin BBK olgularının metastaz yapma potansiyeli üzerindeki belirleyiciliğini ortaya koyan çalışmalar yetersizdir. Çalışmamızda, EGFR, CK19, CK20 ve Survivin'in ayrı ayrı ve birlikte ele alınarak GS üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ancak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Ancak gerçekleştirilen çalışmadaki takip süresinin kısalığından dolayı metastaz oluşumu ile ilişkilendirilmesi gereken diğer önemli parametre olan hastalısız sağkalım süresi ile ilgili bir analiz yapılamamıştır. BBK'li olgularda RT'den sağlanacak yararın artırılabilmesi için, bahsi geçen genler ve kanda

sirküle olarak bulunabilen diğer markerların metastatik potansiyeli ile ilgili yapılacak çalışmaların arttırılması gerektiğine inanmaktayız.

## KAYNAKLAR

1. Forastiere AA, Ang KK, Brizel, et al. National Comprehensive Cancer Network, Head and neck cancer. 2008, 646–95
2. Licitra L, Grandi C, Guzzo M, et al. Primary chemotherapy in resectable oral cavity squamous cell cancer: a randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2003;21:327-33
3. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, et al. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:890-9
4. K.K. Ang. Multidisciplinary management of locally advanced SCCHN: optimizing treatment outcomes. *The Oncologist* 2008;13:899-910
5. Zimmerman M, Zauhair A, Özşahin M, Azria D. The Epidermal growth factor reseptor (EGFR) in head and neck cancer its role and treatment implications. *Radiation Oncology* 2006;1:11
6. Wanebo HJ, Ghebremichael M, Burtness B. et al. Phase II evaluation of cetuximab (C225) combined with induction paclitaxel and carboplatin followed by C225, paclitaxel, carboplatin, and radiation for stage III/IV operabile squamous cancer of the head and neck *Journal of Clinical Oncology* 2007;25: 6015
7. Bandres E, Barricarte R, Cantero C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphisms and survival in head and neck cancer patients. *Oral Oncology* 2007;43:713-19
8. Khan Z, Khan N, Tiwari RP, Bisen PS, Prasad GB, Patro IK. Down-regulation of survivin by oxaliplatin diminishes radioresistance of head and neck squamous carcinoma cells. *Radiotherapy Oncology* 2010;96:267-73
9. Lin JC, Chen KY, Wang WY, Jian SJ, L Wen Miin, Wei YauHuei Evaluation of cytokeratin-19 mRNA as a tumor maker in the peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Int.J.Cancer* 2002;97:548-553
10. Toyoshima T, Vairaktaris E. Schlegel KA, Wilhelm F, R Jutta. Hematogenous cytokeratin 20 mRNA Detection Has Prognostic Impact in Oral Squamous Cell Carcinoma Preliminary Results. *Anticancer Research* 2009;29:291-298
11. Million RR, Cassisi NJ. General principles for treatment of cancers of the head and neck: the primary site. In: Cassisi NJ, Million RR. editors. *Management of head and neck cancer: a multidisiplinary approach.* Philadelphia : Lippincott, 1994, 61-74
12. Kayıhan E., Levent E. Baş Boyun Kanserleri. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti, 2003;127
13. Barret A, Dobbs J, Morris S, Roques T. Pratical Radioterapy Planning, Fourth ed. Chapter: Head and neck general considerations. 2009;88-110, 463

14. Ridge JA, Glisson BS, Lango MN, Feigenberg S. Cancer Management A Multidisciplinary Approach. Chapter: Head and Neck Tumors. 12th Edition 2009;872
15. Zorat PL, Paccagnella A, Cavaniglia G, et al. Randomized phase III trial of neoadjuvant chemotherapy in head and neck cancer: 10-year follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1714-17
16. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007; 357:1705-15
17. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 2005;27:843-50
18. Brizel DM, Esclamado R. Concurrent chemoradiotherapy for locally advanced, nonmetastatic, squamous carcinoma of the head and neck: consensus, controversy, and conundrum. *J Clin Oncol* 2006;10:2612-7
19. Pignon JP, le Maître A, Bourhis J. Meta-Analyses of Chemotherapy in Head and Neck Cancer (MACH-NC): an update. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:112-4
20. Kayıhan E., Levent E. Baş Boyun Kanserleri. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti 2003;140
21. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol* 1998;16:1310-7
22. Gupta NK, Pointon RC, Wilkinson PM. A randomised clinical trial to contrast radiotherapy with radiotherapy and methotrexate given synchronously in head and neck cancer. *Clin Radiol* 1987;38:575-81
23. Akman F. Yerel ileri baş-boyun kanserlerinde kemoradyoterapi. *Türkiye Klinikleri, J Med Oncol-Special Topics* 2010;3:36-40
24. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, et al. An intergroup phase III comparison of Standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:92-8
25. Perez CA, Ackerman LV, Mill WB, Ogura JH, Powers WE. Cancer of the nasopharynx. Factors influencing prognosis. *Cancer* 1969;24:1-17.
26. Haber MH, Gattuso P, Spitz DJ, David O. Differential diagnosis in surgical pathology. Philadelphia : W.B. Saunders Company 2002;363-453
27. Perez CA, Brady LW, Halperon EG, et al,. Principles and practice of radiation oncology.4 th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins 2004;1022-70.
28. Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 2001;92:3030-36.
29. Chua DT, Sham JS, Kwong DL, Choy DT, Au GK, Wu PM . Prognostic value of paranasopharyngeal extension of nasopharyngeal carcinoma. A significant factor in local control and distant metastasis. *Cancer* 1996;78:202-10.

30. Van der Wal JE, Becking AG, Snow GB, Van der Waal. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck* 2002;24: 779-83
31. Gallo O, Bianchi S, Giannini A, Gallina E, Libonati GA, Fini-Storchi O. Correlations between histopathological and biological findings in nasopharyngeal carcinoma and its prognostic significance. *Laryngoscope* 1991;101: 487-93
32. Heng DM, Wee J, Fong KW, et al. Prognostic factors in 677 patients in Singapore with nondisseminated nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1999, 15;86:1912-20
33. Baumann M, Liertz C, Baisch H, Wiegel T, Lorenzen J, Arps H, Impact of overall treatment time of fractionated irradiation on local control of human FaDu squamous cell carcinoma in nude mice *Radiotherapy Oncol*, 1994 ;32(2):137-43
34. Lee AW, Chan DK, Fowler JK, et al. Effect of time, dose and fractionation on local control of NPC. *Radiother Oncol* 1995;36:24-31
35. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993;11:1873–78
36. Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF- $\alpha$  and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:824-32
37. Chen YF, Chen FJ, Fang Y, Yang AK, Zhang Q, Wu GH. Survivin expression in laryngeal SCC and it's relationship with clinical factors. *Ai Zheng*. 2004;23:1493-7
38. Su L, Wang Y, Xiao M, Lin Y, Yu L. Up-regulation of survivin in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis and chemoresistance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:484-91
39. Zhong LP, Chen WT, Zhang CP, Zhang ZY. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:377-84
40. Becciolini A, Porciani S, Lanini A, Tommasi M, Olmi P, Chiavacci A. Prognostic Significance of Tissue Polypeptide Antigen (TPA) in Head and Neck Carcinomas. *Acta Oncologica* 1993;3: 295-99
41. Gallo O, Franchi A, Bianchi S, Boddi V, Giannelli E, Alajmo E P53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer* 1995;75:2037-44
42. Lim JJ, Kang S, Lee MR, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, Ki-67 and prognosis. *J Oral Pathol Med*. 2003;32:552-61
43. Press MF, Pike MC, Hung G, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: Correlation with poor prognosis. *Cancer Res*. 1994;54:5675-82
44. Lo YM, Chan LY, Lo KW, et al. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1999;59:1188-91



45. Chua DT, Nicholls JM, Sham JS, Au GK. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:11-20
46. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS. Cyclin D1 and p 16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2810
47. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer*. 2005;41:683-93
48. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Metaanalysis of the impact of HPV on cancer risk and overall survival in HNSCC. *Head Neck Oncol*. 2010;29:15
49. Holland EC, Hively WP, DePinho RA, Varmus HE. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev*. 1998;12:3675-85
50. Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res* 2006;12:5064–73
51. Weppler SA, Li Y, Dubois L et al. Expression of EGFR variant vIII promotes both radiation resistance and hypoxia tolerance. *Radiotherapy & Oncology*. 2007;83:333-39
52. Tinhofer I, Klinghammer K, Weichert W et al. Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res*. 2011;17:5197-204
53. Harari Paul M, Wheeler Deric L, Grandis J.R et al. Molecular Target Approaches in Head and Neck Cancer: EGFR and Beyond. *Semin Radiat Oncol* 2009;19:63-68
54. Chow NH, Chan SH, Tzai TS, Ho CL, Liu HS. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001;7:1957-62
55. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. 2010;11:21-8
56. Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer*. 2003;39:1348–54
57. Sheridan MT, Seymour Colin B, Mothersill CE. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. 1997; 5:180-86
58. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15: 1191–97

59. Moussa O, Abol-Enein H, Bissada NK, Keane T, Ghoneim MA, Watson DK. Evaluation of survivin reverse transcriptase-polymerase chain reaction for non-invasive detection of bladder cancer. *J Urol* 2006; 175:2312-6
60. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspase: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22:229-306
61. Monzo M, Rosell R, Felip E, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100-4
62. Freier Kolja, Pungs Susanne, Sticht Carsten, et al. High Survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. *Int.J.Cancer* 2006;120:942-46
63. Tunca B, Egeli U, Cecener G, et al. CK19, CK20, EGFR and HER2 status of circulating tumor cells in patients with breast cancer. *Tumori* 2012;98:243-51
64. Cheng CW, Yu JC, Wang H W et al. The clinical implications of MMP-11 and CK20 expression in human breast cancer. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 234-41
65. Min Yun Sook, Yi Eun Hee, Lee Jin Koo et al. CK20 Expression Enhances the Invasiveness of Tamoxifen-resistant MCF-7 Cells. *Anticancer Research*. 2012;32:1221-28
66. Zardavas D, Cameron D, Krop I et al. Beyond Trastuzumab and lapatinib. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013;2-11
67. Pirker R. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in FLEX study patients with advanced NSCLC. 14th World Conference on Lung Cancer. *Lancet* 2009;373: 1525-31
68. Cripps C, Winquist E, Devries MC, Stys-Norman D, Gilbert R. EGFR targeted therapy in Stage 3 and 4 head and neck cancer. *Current Oncology* 2010;17:37-48
69. Psyrri A, Seiwert TY, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2013;246-55
70. Maurizi M, G. Almadori, G. Ferrandina et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma *Br J Cancer* 1996;74:1253-57
71. Astrasaturov I, Cohen RB, Harari PM. EGFR Targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; 7:650-65
72. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2006; 354:567-78
73. Million RR, Cassisi NJ. General principles for treatment of cancers of the head and neck. [book auth.] Cassisi NJ, editors, Million RR. Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach. Philadelphia : Lippincott 1994;61-74
74. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent

- postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck* 2005;27:843-5
75. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 2009;92:4-14
  76. Dulguerov P, Jacobsen MS, Allal AS, Lehmann W, Calcaterra T. Nasal and paranasal sinus carcinoma: are we making progress? A series of 220 patients and a systematic review. *Cancer* 2001;92:3012-29
  77. Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. *Cancer* 2005;103:2435-46
  78. Zhao S, Liu Y, Zhang Q, et al. The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) detected by RT-PCR in breast cancer: a meta-analysis of published literature. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130:809-816
  79. Shimada R, Linuma H, Akahane T, Horiuchi A, Watanabe T. Prognostic significance of CTCs and CSCs of tumor drainage vein blood in Dukes' stage B and C colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2012;27:947-53.
  80. Yang RN, Yang SH, Chang CC, Chien CC, Pan S, Huang CJ. Upregulation of fecal cytokeratin 19 is associated with prognosis in older colorectal cancer patients. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14:703-8.
  81. Wollenberg B, Walz A, Kolbow K, Pauli C, Chaubal S, Andratschke M. Clinical relevance of circulating tumour cells in the bone marrow of patients with SCCHN. *Onkologie* 2004;27:358-62
  82. Andratschke M, Pauli C, Stein M, Chaubal S, Wollenberg B. MHC-class I antigen expression on micrometastases in bone marrow of patients with head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res* 2003; 23:1467-71
  83. Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, et al. Limitations of specific reverse-transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1998;16:2632-40
  84. Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71:278-81
  85. Zhu H, Wang Q, Hu C, et al. High expression of survivin predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma following radiotherapy. *Tumour Biol* 2011;32:1147-53.
  86. Farnebo L, Jerhammar F, Ceder R, et al. Combining factors on protein and gene level to predict radioresponse in head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:739-46
  87. Zhang S, Xiao J, Zhao S, et al. Expression and significance of Survivin mRNA in xenotransplanted nasopharyngeal carcinoma treated by paclitaxel combined with radiotherapy. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2009;23:796-9

**TEŞEKKÜR**

Çalışmamın tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. Lütfi ÖZKAN ve Yrd.Doç.Dr. Candan DEMİRÖZ başta olmak üzere, uzmanlık eğitimim süresince ders aldığım bütün öğretim üyelerine, Tıbbi Biyoloji ve Patoloji Ana Bilim Dalı hocalarıma, Tıbbi Biyoloji Araştırma Görevlisi Gülçin Tezcan'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşım Sonay Arslan'a, Tıbbi Radyofizik Uzmanı ve teknisyen arkadaşlarıma, manevi desteğiyle yanımda olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

## **ÖZGEÇMİŞ**

24 Kasım 1974 yılında Ankara'da doğdum. İlköğrenimimi Bursa'da, orta ve lise öğrenimimi Balıkesir'de tamamladım. 1992 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesinde Tıp eğitimime başladım. 1998 yılında Tıp Doktoru ünvanı ile mezun oldum. 12 Nisan 2007 de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında ihtisas eğitimime başladım.