

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**LARENKS KANSERLİ HASTALARDA TNFA GENİNİN
PROMOTER BÖLGESİNDEKİ POLİMORFİK
DEĞİŞİKLİKLER İLE METİLASYON VE EKSPRESYON
DURUMLARININ İNCELENMESİ**

SEVDE CÖMERT

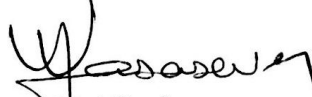
**DANIŞMAN
DOÇ.DR.SEMRA DEMOKAN**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ PROGRAMI**

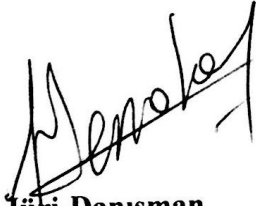
İSTANBUL-2017

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Deneysel ve Moleküler Onkoloji Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans öğrencisi Sevde CÖMERT tarafından Doç.Dr.Semra DEMOKAN'ın danışmanlığında hazırlanan "Larenks Kanseri Hastalarda TNFA Geninin Promoter Bölgesindeki Polimorfik Değişiklikler İle Metilasyon ve Ekspresyon Durumlarının İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 11/08/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı**

Prof.Dr.Vildan YASASEVER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

**Jüri-Danışman**

Doç.Dr.Semra DEMOKAN
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

**Jüri**

Prof.Dr.Canan ALATLI
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri

Prof.Dr.Hülya YAZICI
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr.Meral YÜKSEL
Marmara Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksekokulu

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

"Ad Soyadı" (İmza)

Sevde CÖMERT

İTHAF



Annem Ömür CÖMERT'e ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Sayın Prof. Dr. Ahmet KİZİR'e

Temel Onkoloji Anabilimdalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Vildan YASASEVER'e

Tez çalışmamda çalışmalarımı yönlendiren, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Semra DEMOKAN'a,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Murat ULUSAN, Uzm.Dr. Necati ENVER, Dr.Can DORUK'a,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen Bio.Msc.Zübeyde Yalnız KAYIM ve değerli çalışma arkadaşlarım Sena ŞEN ve Önder ERYILMAZ'a,

Uzakta olsalar da her zaman güvenleri, maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan, her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem, babam ve biricik kardeşime teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: İÜ-BAP-TYL-2017-23885

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Epigenetik	4
2.1.1. DNA Metilasyonu	5
2.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi	6
2.3. Larenks Kanseri	6
2.3.1. Larenksin Anatomisi	6
2.3.2. Larenks Kanserinin Epidemiyolojisi.....	7
2.3.3. Larenks Kanserinin Etiyolojisi.....	8
2.3.4. Larenks Kanserinin Histopatolojisi.....	8
2.3.5. Larenks Kanserinin Belirtileri.....	9
2.3.6. Larenks Kanserinde Prognostik Faktörler.....	9
2.3.7. Larenks Kanserinde Evreleme	10
2.3.8. Larenks Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	12
2.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (<i>TNFA</i>)	15
2.4.1. <i>TNFA</i> Sinyal İletimi	17
2.4.2. <i>TNFA</i> ve Kanser İlişkisi	20
2.4.3. Anti- <i>TNFA</i> Tedavisinin Kanser ile İlişkisi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Materyal	22

3.1.2. Kullanılan Cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Karışımlar	24
3.1.5. Restriksiyon Enzimleri ile Tanıma Bölgeleri.....	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi	26
3.2.1.1. Doku Eldesi.....	26
3.2.1.2. Serum Eldesi	26
3.2.1.3. Tükürük Eldesi	27
3.2.1.4. Lenfosit Eldesi	27
3.2.2. DNA İzolasyonu	28
3.2.2.1. Dokudan DNA Eldesi	28
3.2.2.2. Serum, Tükürük ve Lenfositten DNA Eldesi.....	28
3.2.3. RNA İzolasyonu.....	29
3.2.4. cDNA Sentezi	30
3.2.5. Primer Tasarımı ve Sentezi	31
3.2.6. Restriksiyon Enzim Kesim Tekniği ile Metilasyon Profilinin Belirlenmesi	31
3.2.7. Semi-Kantitatif Reverse Transkriptaz PCR Tekniği ile Gen Ekspresyon Analizi	33
3.2.8. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Tekniği ile Polimorfik Bölgelerin İncelenmesi	34
3.2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR).....	34
3.2.8.2. Restriksiyon Enzim Kesim İşlemleri	35
3.2.9. Veri Analizi.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. <i>TNFA</i> Geninin Promoter Bölgesindeki Polimorfizmlerin İncelenmesi	40
4.2. <i>TNFA</i> Geninin Semi-Kantitatif RT-PCR Sonuçları.....	46
4.3. Restriksiyon Enzim Kesim Tekniği ile Metilasyon Profilinin Belirlenmesi	46
4.4. Metilasyona bağlı ekspresyon durumundaki değişiklikler	48
4.5. Polimorfik genotiplerle metilasyon durumu arasındaki ilişkinin incelenmesi	48
4.6. Polimorfik farklılıkların birlikte bulunma durumları.....	49
4.7. Polimorfik Değişiklikler ile Metilasyona Bağlı Ekspresyon Durumu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi	50

5. TARTIŞMA	51
KAYNAKLAR	55
HAM VERİLER	71
FORMLAR	72
ETİK KURUL KARARI	76
PATENT HAKKI İZİNİ	80
TELİF HAKKI İZİNİ.....	81
ÖZGEÇMİŞ	82



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1-1:Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN-2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu (Deri Dışında Kalan Kanserlerin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Oranları)	1
Tablo 2-1: Larenks kanseri T evrelemesi	11
Tablo 2-2: Larenks kanseri N evrelemesi	11
Tablo 2-3: Larenks kanseri M evrelemesi	11
Tablo 2-4: Larenks kanseri klinik ve prognostik evreleme	12
Tablo 3-1: Polimorfizm deneylerinde kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri..	26
Tablo 3-2: Metilasyon deneylerinde kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri	26
Tablo 3-3: Dokudan DNA izolasyonu	28
Tablo 3-4: Serum, tükürük ve lenfositten DNA izolasyonu	29
Tablo 3-5: Dokudan RNA izolasyonu	30
Tablo 3-6: cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	31
Tablo 3-7: Metilasyon, ekspresyon ve polimorfizm deneylerinde kullanılan primerler	31
Tablo 3-8: Metilasyon deneyinde kullanılan restriksiyon enzim karışımı	32
Tablo 3-9: Metilasyon deneyi reaksiyon karışımı	32
Tablo 3-10: Metilasyon deney koşulları	33
Tablo 3-11: Semi-kantitatif RT-PCR reaksiyon karışımı	33
Tablo 3-12: Semi-kantitatif RT-PCR deney koşulları	34
Tablo 3-13: Polimorfizm deneylerinde kullanılan reaksiyon karışımı	35
Tablo 3-14: Polimorfizm deneylerinde kullanılan PCR koşulları	35
Tablo 3-15: Restriksiyon enzimleriye kesim işleminde kullanılan reaksiyon karışımı..	35
Tablo 4-1: Larenks kanserli hastalara ait parametrelerin sayısal dağılımı	37
Tablo 4-2: Sağlıklı bireylere ait demografik verilerin dağılımı.....	38
Tablo 4-3:Larenks kanserli hastalara ait klinik bilgiler	39
Tablo 4-4 : <i>TNFA</i> gen polimorfizmlerinin larenks kanserli hasta ve sağlıklı gruptaki genotip ve allel frekanslarının hastalık riski açısından analizi	45
Tablo 4-5: c.-1031T>C genotip dağılımının alkol kullanımı ile ilişkisi.....	46
Tablo 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında haplotip frekanslarının analizi.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Larenks kanserinin anatomisi.....	7
Şekil 2-2: Türkiye’de her iki cinsiyete göre larenks kanseri dağılımı	7
Şekil 2-3: Larenks kanserinin gelişim mekanizmasını temsil eden güncel model	15
Şekil 2-4:TNFA ligand ve reseptörleri	16
Şekil 2-5: TNFA sinyal yolları.....	18
Şekil 4-1: c.-238G>A polimorfizm bölgesini içeren 155 bp’lik PCR ürünü.....	40
Şekil 4-2:c.-238G>A polimorfizmi BamHI enzim kesim ürünleri.....	40
Şekil 4-3: c.-308G>A polimorfik bölgesini içeren 147 bp’lik PCR ürünü.....	41
Şekil 4-4:c.-308G>A polimorfizmi NcoI enzim kesim ürünleri.....	41
Şekil 4-5: c.-806C>T polimorfik bölgesini içeren 184 bp’lik PCR ürünü	41
Şekil 4-6: c.-806C>T polimorfizmi MnlI enzim kesim ürünleri	42
Şekil 4-7: c.-857C>T polimorfik bölgesini içeren 128 bp’lik PCR ürünü	42
Şekil 4-8: c.-857C>T polimorfizmi TaiI enzim kesim ürünleri.....	42
Şekil 4-9: c.-863C>A polimorfik bölgesini içeren 147 bp’lik PCR ürünü.....	43
Şekil 4-10: c.-863C>A polimorfizmi TaiI enzim kesim ürünleri	43
Şekil 4-11: c.-1031T>C polimorfik bölgesini içeren 264 bp’lik PCR ürünü	43
Şekil 4-12: c.-1031T>C polimorfizmi BbsI enzim kesim ürünleri.....	44
Şekil 4-13: TNFA geni semi-kantitatif RT-PCR ürünleri	46
Şekil 4-14:TNFA geninin promoter bölgesinin restriksiyon enzim kesimi sonrası oluşan metilasyon durumu ve PCR örnekleri.....	47
Şekil 4-15: Larenks kanserli hastaların tümör, eşlenik normal doku ile serum ve tükürük örneklerinde metilasyon görülme oranı	47
Şekil 4-16: Sağlıklı bireylere ait normal doku ile serum ve tükürük örneklerinde metilasyon görülme oranı	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

THSK:	Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
IARC:	Uluslararası Kansere Ajansı
AJCC:	Amerikan Kansere Komitesi
YEH:	Yassı epitel hücre
GWAS:	Genom çapında yapılan çalışma
RNA:	Ribonükleik asit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
cDNA:	Komplementer DNA
DNMT:	DNA metil transferaz
HPV:	İnsan papilloma virüsü
TSG:	Tümör baskılayıcı gen
LOH:	Heterozigotluk kaybı
NER:	Nükleotid eksizyon tamiri
SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi
VHL:	Von Hippel-Lindau
CDKN2A:	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
TLX1:	T-Cell Leukemia Homeobox 1
CAGE1:	Cancer/Testis Antigen Gene 1
PLAU:	Plasminogen aktivatör ürokinaz
SERPINB5:	Serine Proteinase Inhibitor, Clade B Member 5
SNCG:	Synuclein Gamma
FISH:	Floresan in situ hibridizasyon
ERCC5:	Excision Repair Cross-Complementation Group 5
ERCC6:	Excision Repair Cross-Complementation Group 6
RAD23B:	RAD23 Homolog B
TNFR1:	Tümör nekrozis faktör reseptör-1
TNFR2:	Tümör nekrozis faktör reseptör-2
TNFA:	Tümör nekrozis faktör-alfa

ÖZET

Cömert, S. Larenks kanserli hastalarda TNFA geninin promoter bölgesindeki polimorfik değişiklikler ile metilasyon ve ekspresyon durumlarının incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2017.

Larenks kanserleri, baş-boyun kanserleri arasında en yaygın olarak görülen ikinci kanser tipidir. Larenks kanserlerinin etiyojisinde sigara, alkol gibi fiziksel ve kimyasal karsinojenlerin zararlı etkisine maruz kalmak gibi çevresel etkenler gözlenmekte, bunlar aynı zamanda hücrel immunitiyi de baskılamaktadır. Günümüzde larenks kanserinde erken tanı, prognoz, nüks riski olan hastaları ayırt etmeye yönelik güvenilir biyobelirteçler bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 50 larenks kanserli hastanın tümör, eşlenik normal doku ve vücut sıvıları (tükürük, serum) ile 20 sağlıklı bireye ait normal doku ve vücut sıvıları (tükürük, serum) kullanılarak TNFA geninde metilasyona bağlı ekspresyon durumu ile promoter bölgesinde bulunan c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A ve c.-1031T>C polimorfizmleri incelenmiştir.

Hastaların %84'ünde TNFA geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenirken, %56'sında TNFA gen ekspresyonunda azalma görülmüştür. Metilasyon görülen hastaların %42'sinde metilasyona bağlı ekspresyon durumunda azalma gözlenmiştir. Metilasyon varlığı ile hastaların klinikopatolojik verileri karşılaştırıldığında ileri evre hastalarda (evreIII-IV), erken evre hastalara (evreI-II) göre metilasyon varlığı görülmüştür. TNFA gen polimorfizmleri ile hasta ve sağlıklı gruptaki genotip ve allel frekansları değerlendirildiğinde c.-308G>A ve c.-1031T>C polimorfizmlerinin hastalık riski açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Hasta ve kontrol grupları arasında polimorfik değişikliklerin haplotip frekansları incelendiğinde ise, c.-238G>A/c.-308G>A, c.-238G>A/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-863C>A, c.-308G>A/ c.-1031T>C, c.-857C>T/c.-863C>A, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-857C>T, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-863C>A, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-857C>T/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-863C>A/c.-1031T>C haplotip kombinasyonlarının anlamlı derecede hastalık riski ile ilişkili oldukları gözlenmiştir.

TNFA geninde gözlenen metilasyona bağlı olarak ekspresyon yokluğunun ve polimorfik farklılıkların larenks karsinogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamıza daha geniş hasta grubunda devam ederek istatistiksel anlamlılığı arttırmayı hedeflemekteyiz.

Anahtar Kelimeler: larenks kanseri, TNFA, metilasyon, ekspresyon, polimorfizm

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: İÜ-BAP-TYL-2017-23885)

ABSTRACT

Cömert S. Investigation of methylation and expression status and polymorphic changes in the promoter region of TNFA gene in laryngeal cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology, Master Thesis, Istanbul. 2017.

Larynx cancer is the most common cancer type in the head and neck cancer. In the etiologic factors of larynx cancer, exposure to the harmful effects of physical and chemical carcinogens, such as tobacco usage, alcohol consumption. There is no reliable biomarkers in larynx cancer to predict prognosis and early diagnosis.

In our study, the polymorphic differences (c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A, c.-1031T>C) in the promoter region with the methylation and expression states of the TNFA gene examined in patients with larynx cancer and healthy individuals.

The promoter region of the TNFA gene was methylated in 84% of patients compared to those in matched normal tissue and in the expression status of TNFA gene was not observed 56% of the patients. in the expression status was observed in 42% reduction depending on the methylation. When we analyzed the association of the clinical variables with the methylation status, observed higher in advanced stage patients (stageIII-IV), compared to early stage patients (stageI-II). When we compared allele and genotyp frequencies, -308 G> A and c.-1031T>C significantly associated with reduced risk of cancer.

We used the SNPalyze test for case–control haplotype analysis and found highly significant association was observed for the c.-238G>A/c.-308G>A, c.-238G>A/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-863C>A, c.-308G>A/ c.-1031T>C, c.-857C>T/c.-863C>A, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-857C>T, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-863C>A, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-857C>T/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-863C>A/c.-1031T>C haplotypes.

The lack of expression due to methylation observed in the TNFA gene and polymorphic differences are thought to be related to LC. We aim to increase statistical significance in progress to include a larger cohort of patients.

Key Words: larynx cancer, TNFA, methylation, expression, polymorphism.

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University. Project number: (IU-BAP-TYL-2017-23885)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser dünyada kardiovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm sebebi olması açısından önemli bir sağlık problemidir (1). Türkiye Kanserle Savaş Daire Başkanlığı tarafından 2014 yılında kanser insidansı yüz binde 210,2 olarak bulunmuştur. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2012 dünya kanser istatistiklerine göre toplam 14,1 milyon yeni kanser vakasından 8,2 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleşmiştir (2). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK), Kanser Daire Başkanlığı tarafından Türkiye Birleşik Veri Tabanı'nda yayınlanan 2014 yılı değerlendirme sonuçlarına göre kanserin yaşa ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 1-1'de gösterilmiştir (3).

Tablo 1-1:Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN-2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu (Deri Dışında Kalan Kanserlerin Yaşa Göre Standardize Edilmiş Oranları)

	Erkek*	Kadın*
Dünya	204,9	165,2
IARC'a üye 24 ülke	235,4	192,1
AB (28 ülke)	311,3	241,4
ABD	347,0	297,4
Türkiye**	220,3	156,8

*100.000 kişide yaşa göre standardize edilmiş oran **Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2014

Tüm kanser vakalarının %4'ünü oluşturan baş-boyun kanserleri dünya çapında görülme sıklığı açısından 6. sırada yer almaktadır. Baş-boyun kanserlerinin yaklaşık %90'ı, yassı epitel hücreli (YEH) karsinomlardır. Larenks kanseri, baş-boyun kanserleri arasında en yaygın olarak görülen ikinci kanser tipi olup yaklaşık %95'i YEH'den köken almaktadır (1, 4- 6).

Larenks kanserinin etiyolojisinde çevresel etkenler olarak sigara, alkol ile fiziksel ve kimyasal karsinojenlerin zararlı etkileri gözlenmektedir. Bu faktörler aynı zamanda hücrel immunitiyi de baskılamaktadır (7). Sitokinler doğrudan veya dolaylı

olarak malinite gelişiminde aşağı yönlü sinyal yollarını aktive eden düzenleyici ağıın bir parçası olan önemli inflamatuvar araçlardır. Sitokinleri ve bunların reseptörlerini kodlayan genlerin daha çok promoter bölgelerinde bulunan tek nükleotit polimorfizmleri (SNPs) ile insan kanser yatkınlığını gösteren kanıtlar bulunmaktadır (8-11).

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNFA) inflamatuvar ve infeksiyöz hastalıklarda görev alan proinflamatuvar sitokindir (12). *TNFA* geni 6. kromozomda yer alan major histokompatibilite kompleks sınıf-III gen bölgesi içinde yer alır. Bu gen normalde hücrel immünitede konağın yararına hareket ederken, kontrolsüz ve aşırı üretimi tüberküloz, diyabet, hepatit B gibi hastalıkların gelişimi ile ilişkili olabilir (13-16). Tümör hücrelerine karşı polimorfonükleer lökositleri ve sitotoksik etkileri aktifleyerek immun yanıtı düzenler, ayrıca anjiogenez ve apoptozda da görev alır (13-16).

TNFA gen polimorfizmleri çeşitli kanserlere yatkınlıkla ilişkilidir (12). Literatürde meme (17), mide (18), prostat (19), kolorektal kanserler (20) ve non-Hodgkin lenfoma (21) ile bu genin polimorfik değişiklikler arasındaki ilişki incelenmiştir. *TNFA* gen ekspresyon seviyesinin artışının kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (13, 18, 22). Literatürde *TNFA* gen polimorfizmleri ile larenks kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Kanserde hem genetik hem de epigenetik değişiklikler rol oynamaktadır. Birçok kanser türünde tümör baskılayıcı genlerin (TSG) promoter bölgelerindeki CpG adalarının metillenmesi sonucu bu genlerin görevini yerine getiremediği ve ekspresyon seviyelerinde buna bağlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir (22-25). Literatürde, *TNFA* gen promoter metilasyonu ve buna bağlı ekspresyon seviyesindeki değişimler ile kolorektal (22), prostat (23), meme (24) ve serviks (25) kanserleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar mevcuttur. Ancak larenks kanseriyle ilişkisini inceleyen çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Projemizde, larenks bölgesinde yassı epitel hücreli karsinom tanısı almış 50 hastadan alınan tümör, eşlenik normal doku, tükürük ve serum örnekleriyle; kendisinde ve ailesinde malin ya da benin hikayesi bulunmayan 20 sağlıklı (kontrol) bireye ait normal mukoza, tükürük ve serum örneklerinde *TNFA* geninin promoter bölgesinde bulunan polimorfik değişiklikler [c.-238G>A (NM_000594.3:c.-418G>A, rs361525), c.-308G>A (NM_000594.3:c.-488G>A, rs1800629), c.-806C>T (NM_000594.3:c.-

986C>T), c.-857C>T (NM_000594.3:c.-1037C>T, rs1799724), c.-863C>A (NM_000594.3:c.-1043C>A, rs1800630), c.-1031T>C (NM_000594.3:c.-1211T>C, rs1799964)] ile promoter metilasyon düzeyi ve buna bağlı ekspresyon seviyeleri incelenmiş olup elde edilen veriler ile klinikopatolojik parametreler karşılaştırılmıştır. Larenks kanserinde hem *TNFA* gen polimorfizmleri hem de promoter metilasyon düzeyi ve buna bağlı ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmanın literatürde bulunmamaktadır. Bu da projemizin orjinalliği ve özgün değerini arttırmaktadır. Projemizde *TNFA* geninin biyobelirteç olarak kullanım potansiyelinin belirlenerek non-invaziv yöntemlerle tanı, teşhis, tedavi takibinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

Kanser oluşumu, genetik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu hataların bir sonucu olarak ortaya çıkan çok basamaklı bir süreçtir (26). Bu süreçte kanser hücreleri, tümöre özgü büyüme sinyalinin sürekli olması, sürekli bölünme, hücre ölümüne direnç geliştirme, büyümeyi baskılayıcı mekanizmalardan kaçış, anjiogenezin indüklenmesi, invazyon ve metastaz yapabilme, mutasyon oluşumu ve genomik kararsızlık, enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, bağışıklık sisteminden kaçış ile anjiogenez gibi özellikler kazanırlar (27).

Kanser oluşumunda nokta mutasyonları, delesyonlar ve translokasyonlar gibi genetik değişikliklerin rol oynadığı bilinmektedir (26). Bununla birlikte genetik mekanizmalar kadar epigenetik mekanizmalarında kanser oluşumuna katkısının olduğu literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir (22-25).

Projemiz ile ilgili olan genetik mekanizmalardan tek nükleotid polimorfizimleri, epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu ve buna bağlı ekspresyon kaybı ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

2.1. Epigenetik

Epigenetik terimi, yaygın bir genotipe rağmen fenotipik farklılıklara neden olan genlerde ve gen ürünlerinde meydana gelen çeşitli değişiklikleri tanımlamak için 1942'de Waddington tarafından başlangıçta embriyonik gelişimde epigenetiğin rolünü incelemesiyle ortaya çıktı (28). Bununla birlikte epigenetiğin tanımı, çok çeşitli biyolojik süreçlerle ilişkilendirilerek zamanla değişmiştir. Günümüzde DNA'nın kodlanan dizisindeki değişikliklerden bağımsız gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişimler olarak tanımlanmaktadır. Bu kalıtsal değişiklikler genelde farklılaşma esnasında gerçekleşir ve bu genetik bilgiyi taşıyan hücrelerin bölünmesiyle süreklilik taşır (29, 30).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenlenmesi ve mikroRNA'larla yeniden düzenlenme gibi epigenetik mekanizmalar, normal memeli gelişiminde ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar (31).

Kalıtsal olarak oluşan epigenetik değişiklikler, çeşitli sinyal yollarının uygun olmayan bir şekilde aktivasyonuna veya inhibisyonuna neden olabilir. Bu değişiklikler

psikiyatrik, nörolojik ve nörodejeneratif hastalıklar, astım, diyabet, immüno-inflamatuar hastalıklar ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olabilmektedir (29, 32, 33).

2.1.1. DNA Metilasyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalarda DNA metilasyonu, promoter hipermetilasyonu ve genom çapında hipometilasyon olmak üzere iki büyük değişiklik şeklinde gösterilmiştir.

DNA metilasyonu CpG dinükleotitlerindeki sitozin bazının 5 numaralı karbon atomuna DNA Metil Transferazlar (DNMT) tarafından metil grubunun aktarılmasıyla gerçekleşir. CpG dinükleotitleri genellikle uzun tekrarlı dizilerde ve genlerin promoter bölgesinde CpG adacıkları şeklinde bulunurlar. Bu bölgelerin metilasyonu ile genlere transkripsiyon faktörlerinin bağlanması engellenerek gen ifadesi susturulur (34-37). Bunun aksine promoter bölgesinde bulunan yüksek CG oranına sahip CpG adalarında meydana gelen hipometilasyon gen ekspresyon seviyesinde artışa neden olabilir (36).

Genlerin promoter bölgelerinde meydana gelen metilasyon ile gen ekspresyonunun durması embriyonik dönemde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde hücrelerde ortaya çıkan normal bir olaydır. Bununla birlikte, TSG'lerin anormal DNA metilasyonunun neoplastik dönüşümde rol oynadığı gösterilmiştir (38, 39). TSG'lerde meydana gelen hipermetilasyon ile kanser oluşumu arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. TSG'lerin hipermetilasyonu ilk olarak retinablastom (*Rb*) geninde gösterilmiştir. Yapılan çalışmada herhangi bir mutasyon olmadan *Rb* geninin %10 oranında metilasyona rastlanmıştır (37, 40). Daha sonra yapılan çalışmalarda *VHL*, *CDKN2A* ve *BRCA1* gibi birçok TSG'nin hipermetilasyon yoluyla inaktif hale geldiği bildirilmiştir (41-43). TSG'lerin promoter bölgelerinde hipermetilasyon kanser hücrelerinin özelliklerinden biri olmasına rağmen, onkogenlerde meydana gelen hipometilasyonda kanser oluşumuna neden olan mekanizmalardan biridir (44). Genlerin DNA hipometilasyonu sonucu aşırı eksprese olduğu bilinmektedir. Kanser ile DNA hipometilasyonu arasındaki ilişkinin incelendiği ilk genlerden biri *Ras* onkogenidir (44). Ayrıca hipometile olduğu bilinen *TLX1*, *MAGE* gen ailesi, *CAGE1*, *PLAU*, *SAIL*, *SERPINB5* ve *SNCG* gibi birçok genin kanser oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (45, 46).

2.2. Tek Nükleotid Polimorfizmi

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), popülasyonda yaygın olarak (>% 1) gözlenen tek baz çifti değişiklikleridir ve bunların belirlenmesi insan genetik hastalıklarının tedavisi ve önlenmesinde önemli bir etkiye sahiptir (47-49).

Genom çapında yapılan çalışmalar (GWAS) sonucu polimorfik değişikliklerin kanserler de dahil çeşitli hastalıklara yatkınlık ve hastalık riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada gen ekspresyonunda önemli rolü olan transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma bölgelerine erişimin bu bölgelerde meydana gelen polimorfizmler sonucu farklılık gösterebileceği bulunmuştur (50).

Polimorfizmin gen promoter bölgesinde oluşması sonucu transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını zorlaştırabilir. Bu bölgede oluşan SNP bir CpG ile sonuçlanıyorsa gen ifadesini baskılayabilir ya da CpG'nin ortadan kalkmasıyla sonuçlanıyorsa gen ifadesinde artışa neden olabilir (47, 51)

Epigenetik varyasyon, genetik varyasyon ve fenotip arasındaki işlevsel ilişkileri anlamaya yönelik gelecek çalışmalar, hastalıkların nedenlerini belirlememize yardımcı olabilir. Herhangi bir kanserdeki moleküler değişiklikleri değerlendirirken genetik ve epigenetik değişiklikleri birlikte incelemenin önemi çok büyüktür; çünkü değişikliklerin kombinasyonu, kanser biyolojisine herhangi bir tek yönlü yaklaşımdan daha iyi bir kavrayış sunar.

2.3. Larenks Kanseri

2.3.1. Larenksin Anatomisi

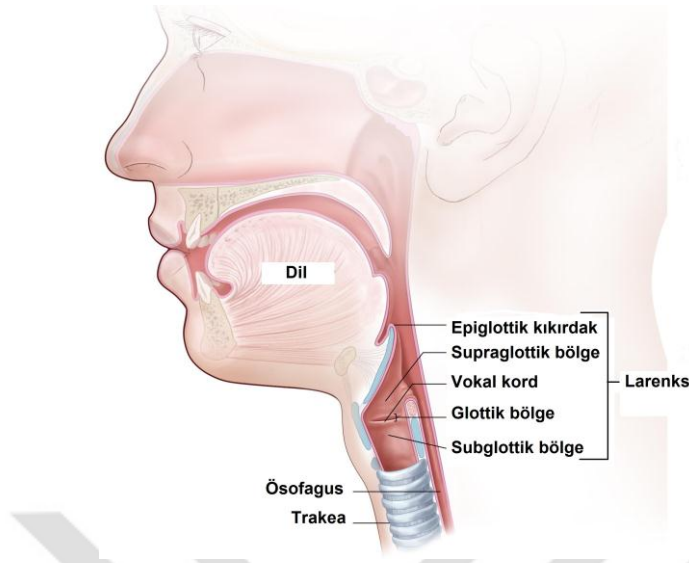
Larenks, boynun ön tarafında 3-6. boyun vertebraları yüksekliğinde, dil kökü ile trakea arasında bulunur.

Neoplastik hastalıkların değerlendirilmesi ve tedavisi amacıyla larenks üç anatomik alt bölgeye ayrılır (Şekil 2-1) (52).

-Supraglottik bölge; larenks epiglottis, yalancı vocal kord, ventriküller, ariepiglottik foldlar ve aritenoidleri içerir.

-Glottik bölge; gerçek vokal kord, posterior ve anterior kommisürleri içerir.

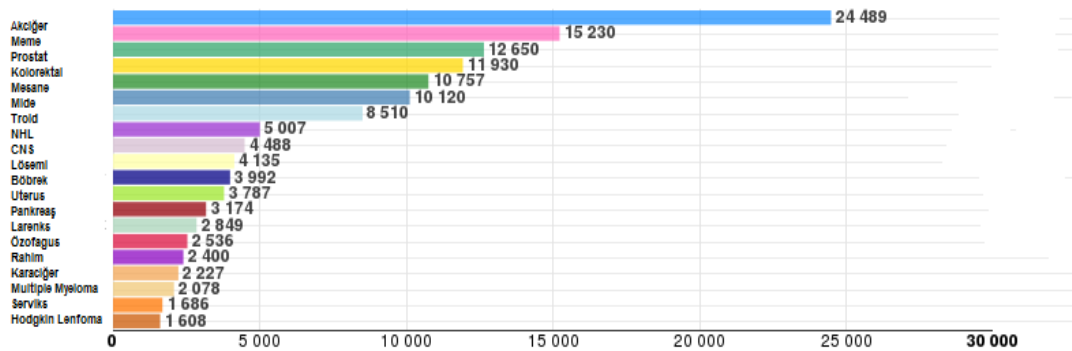
-Subglottik bölge; gerçek vokal kordun serbest kenarının 1 cm altındadır ve krikoid kıkırdağın veya birinci trakeal halkanın alt sınırına kadar uzanır.



Şekil 2-1:Larenks kanserinin anatomisi

2.3.2. Larenks Kanserinin Epidemiyolojisi

Larenks kanseri baş-boyun kanserleri arasında en sık görülen 2. kanser tipidir. IARC tarafından yayınlanan son bildiriye dünyada, bütün kanserler içinde görülme sıklığı açısından 20. sırada yer alırken GLOBOCAN 2012 verilerine göre Türkiye’de görülme sıklığı açısından 14. sırada (Şekil 2-2) yer almaktadır (2, 3).



Şekil 2-2: Türkiye’de her iki cinsiyete göre larenks kanseri dağılımı

2.3.3. Larenks Kanserinin Etiyolojisi

Larenks kanserinin oluşum nedeni tam olarak tanımlanamamakla birlikte kanser gelişimine neden olan bazı risk faktörleri tahmin edilmektedir. Dünyada insidansı giderek artmaktadır ve bu artışın genellikle tütün ve alkol tüketimindeki değişikliklerle ilişkili olduğu kabul edilmektedir (53, 54). Sigara içimi, aşırı alkol tüketimi ile üst aerodinamik yolun skuamöz hücreli kanserlerinin gelişimi arasında açık bir ilişki kurulmuştur ve larenksin bu etiyolojik faktörlere en duyarlı olan organ olduğu öne sürülmüştür (55, 56). Larenks kanseri gelişim riski sigara içenler için sigarayı bıraktıktan sonra azalmakta, ancak yıllar sonra da içmeyenlere kıyasla kansere yakalanma oranı yüksek olmaktadır (57). Sigara ve alkol maruziyetinin larenks kanserinde primer etiyolojik faktör (58-60) olmasıyla birlikte iritan kaynaklı larengeal inflamasyon ve uzun süreli ses kaybı larenks kanseri gelişimine neden olabilir (61).

Tütün maruziyeti ve alkol tüketimi baş-boyun kanserlerinin yaklaşık %75-%80'inin etiyolojik nedeni olmasına rağmen, HPV enfeksiyonu tüm baş ve boyun kanserlerinin %20-25'inde etiyolojik olarak bağlantılıdır (62-64). Larenks kanserinde, HPV DNA prevalansının %3 ile %47 arasında değiştiği bildirilmiştir (65). Bununla birlikte, HPV ile larenks kanseri arasında kesin bir ilişki kurulmadan önce daha ileri çalışmaların gerekli olduğu bildirilmiştir (66)

Larenks kanseri için diğer risk faktörleri kömür tozu, sert alaşım tozu, klorlu solvent (67), asbest (68), inorganik asitler, çimento tozu ve serbest kristal silika gibi mesleki maruziyet sonucu oluşabilir (69, 70).

Larenks kanseri oluşumunda beslenme faktörlerinin de rol oynadığı düşünülmektedir. Tuzlu et ve total yağ alımının larenks kanseri riskinde artışa neden olduğu (71) ve gastroözofageal reflünün de belirlenmiş bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (72).

2.3.4. Larenks Kanserinin Histopatolojisi

Histolojik olarak larenks kanserinin yaklaşık %95'ini YEH'li karsinomlar oluşturur. Diskeratoz, atipi, larengeal intraepitel neoplazma ve displazi gibi lezyonların hafif displaziden in situ karsinoma dönüşüm riski oldukça fazladır (73).

2.3.5. Larenks Kanserinin Belirtileri

Supraglottik kanserde tipik olarak boğaz ağrısı, ağrılı yutma, yansıyan kulak ağrısı, ses kalitesinde değişiklik ve boyun nodlarında büyüme ile kendini gösterir. Saptandığı zaman, subglottik alanda ortaya çıkan kanserler yaygın olarak ses tellerini de içerir. Bu nedenle, semptomlar genellikle bitişik yayılımla kendini gösterir. Erken vokal kordta gelişen larenks kanseri genellikle ses kısıklığından dolayı tespit edilir (74).

Larenks kanserinin tanısı: semptomlar (ses kısıklığı, ses değişikliği, boğazda yumru şeklinde kitle), işaretler (boyunda kitle, larengeal hassasiyet), yardımcı muayene (BT görüntüleme, elektronik larengoskopik tarama, patolojik biyopsi) sayesinde konulur (75).

2.3.6. Larenks Kanserinde Prognostik Faktörler

Larenks kanseri için en önemli prognostik faktör tümör evrelemesidir (76). Diğer prognostik faktörler cinsiyet, yaş, performans durumu (77), devamlı toksik tüketim alışkanlığı (78), ikincil primer tümör oluşumu (79) ve invazyonun gradı ve derinliği gibi çeşitli özellikleri içerebilir (80). Lenf nodlarına yayılmayan küçük boyutlu larenks kanserinin prognozu ise, bölgeye, tümör hacmine (81) ve infiltrasyon derecesine bağlı olarak % 75-95 arasında iyileşme oranına sahiptir.

Erken lezyonların çoğu radyoterapi ya da cerrahi yöntemlerle tedavi edilmesine rağmen, ses tellerini korumak açısından ilk tercih radyoterapi olabilir (82). Lokal olarak ilerlemiş lezyonlar, radyoterapi ve kemoterapi ile birlikte cerrahi uygulama içeren veya cerrahi olmayan kombine tedavi yöntemiyle tedavi edilir (83).

Teşhis anında hastaların yaklaşık % 42'sinde primer bölgeye lokalize hastalık, %47'sinde lenf nodu metastazı %7'sinde uzak bölge metastazı bulunmaktadır (84). Hastaların %62'si evre III veya IV hastalığa sahiptir (85). Larenks alt tiplerine bakıldığında genel olarak supra ve subglottik kanserler glottik kanserden daha kötü prognoza sahiptirler ve erken evrede erken teşhis durumunda 5 yıllık sağkalım %82'dir (1).

Larenks kanserli hastaların yaşam kalitesi son yıllarda organ koruma yaklaşımı gelişmesine rağmen geçtiğimiz 30 yılda sağ kalım oranı değişmemiştir (86). Uzak metastazlar, primer tümör kontrol edilse bile yaygındır. Orta büyüklükteki lezyonlar, lezyon bölgesi, T evresi, N evresi ve performans durumuna bağlı olarak orta derecede

prognoza sahiptir. Bu tip lezyonlara sahip hastalar için terapi önerileri, multidisipliner konsültasyonda tartışılmalı ve bireyselleştirilmesi gereken çeşitli kompleks anatomik, klinik ve sosyal faktörlere dayanmaktadır (85).

Başlangıçta primer lezyonu kontrol altına alınmış olan hastaların %25'inde çoğunlukla aerodigestif yolda olan ikincil primer tümörler bildirilmiştir. Larenks kanseri tedavisi gören hastaların ilk 2-3 yıl nüks riski en yüksek seviyededir. İlk 5 yıl sonrası nüks çok nadir görülür ve genellikle sonrasında oluşan maliniteler primerdir (87). Larenks kanseri olan hastalar ikinci primer tümör gelişimi açısından 5 yılda %14, 10 yılda %26 ve 15 yılda %37 oranında risk altındadır. Kurtarma şansını en üst düzeye çıkarmak için yakın ve düzenli takip önemlidir. Hastaya dikkatli klinik muayene yapılmalı; herhangi bir anormal evrelemeye karşı evreleme tekrarlanmalı, hasta takibine, tedavi ilişkili toksik etkiye veya komplikasyona dikkat edilmelidir (88-89).

2.3.7. Larenks Kanseri Evreleme

Larenks kanseri için evreleme sistemi, klinik muayenede yapılır. Primer tümörün değerlendirilmesi, gözle ve elle muayene ile mümkünse fiberoptik larengoskopiyle yapılmaktadır. Anestezi altında panendoskopi, lokal hastalığın klinik boyutunu belirlemek için dikkatli klinik muayene yapılmasını sağlar. Tümör, histolojik olarak da teyit edilmelidir ve biyopside elde edilen diğer patolojik veriler de evrelemeye dahil edilebilir. Baş ve boyun manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi veya pozitron emisyon tomografisi-bilgisayarlı tomografi, gözle ve elle muayene ek tedavi öncesinde yapılmalıdır (89).

Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) tarafından larenks kanserinin tanımlanması amacıyla T (Tablo 2-1), N (Tablo 2-2), M (Tablo 2-3) sınıflamasına göre evreleme kriterleri ile klinik ve prognostik evreleme (Tablo 2-4) aşağıdaki tablolarda verilmiştir (90).

Tablo 2-1: Larenks kanseri T evrelemesi

Primer tümör (T)	
Tx:	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0:	Primer tümöre ait herhangi bir bulgu yok.
Tis:	İn situ karsinom
Supraglottis	
T1:	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte supraglottisin bir kesimine sınırlı tümör
T2:	Larenks fiksasyonu olmadan supraglottisin birden fazla alt bölgesine veya glottise ya da supraglottis dışında bir bölgeye (dil kökü, vallerkula, piriform sinüsün mediyal duvar mukozası vb.) invaze tümör.
T3:	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya postkrikoid alanın, preepiglottik boşluk, paraglottik boşluktan herhangi birine ve/veya tiroid kırırdağın korteksine invaze tümör.
T4a:	Orta düzeyde lokal ileri hastalık. Tiroid kartilaj ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstremsik kasları dahil boyun yumuşak dokuları, strap kası, tiroid veya özofagus) invaze tümör.
T4b:	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık. Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış.
Glottis	
T1:	Normal vokal kord hareketleriyle birlikte vokal kord (lar) a sınırlı (anterior posterior komissürü tutabilir) tümör.
T1a:	Bir vokal korda sınırlı tümör
T1b:	Her iki vokal kordu tutmuş tümör
T2:	Supraglottise ve/veya subglottise uzanan tümör ve/veya vokal kord hareketlerinde bozukluk
T3:	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı ve/veya paraglottik boşluğa invaze ve/veya tiroid kartilajın iç korteksine invaze tümör.
T4a:	Orta düzeyde lokal ileri hastalık. Tiroid kartilajın dış korteksine ve/veya larenks dışında herhangi bir dokuya (trakea, dilin ekstremsik kasları dahil boyun yumuşak dokuları, strap kası, tiroid veya özofagus) invaze tümör.
T4b:	Çok ileri düzeyde lokal ileri hastalık. Tümör prevertebral boşluğa invaze veya karotid arteri sarmış.
Subglottis	
T1:	Tümör subglottiste sınırlı
T2:	Tümör vokal kord(lar) a uzanmış, kord hareketleri normal ya da bozulmuş.
T3:	Vokal kord fiksasyonu ile birlikte larenkse sınırlı tümör.
T4a:	Tümör tiroid kırırdağı invaze etmiş ve/veya larenks dışı tutulum yapmış (trakea, boyun derin dokuları, tiroid, özofagus)
T4b:	Tümör prevertebral boşluğa tutmuş, karotid arteri sarmış, mediastinal yapılara invaze olmuş

Tablo 2-2: Larenks kanseri N evrelemesi

Nx	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok.
N1	Aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 3 cm olan tek lenf nodu metastazı.
N2a	Aynı tarafta, tek, >3 cm ve ≤ 6 cm lenf nodu metastazı
N2b	Aynı tarafta, çok sayıda ≤ 6 cm lenf nodu metastazı
N2c	İki taraflı ya da karşı tarafta en büyük boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı
N3	>6 cm metastatik lenf nodu metastaz(lar)ı

Tablo 2-3: Larenks kanseri M evrelemesi

Mx	Uzak metastaz varlığı belli değil
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var.

Tablo 2-4: Larenks kanseri klinik ve prognostik evreleme

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

2.3.8. Larenks Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Larenks kanserinin tanısı genellikle geç evrede ortaya çıkar ve bu da tedavi etkinliğini azaltırken nüks oranını artırır. Larenks kanserinin tanısı, tedavi sonrası hastaların izlenmesi ve larenks kanserinin taramasıyla ilgili tedaviye yönelik biyobelirteç bulunmamaktadır. Ancak baş-boyun YEH'li karsinomun moleküler biyolojisinde ve özellikle de larenks kanserinde yapılan yeni keşifler, bu kanserin moleküler temelini anlamaya yönelik bilgi sağlayarak, erken tanı ve tedaviye yönelik stratejilerin geliştirilmesinde önemli rol oynayabilir (66).

1971'de Knudson, bir TSG'nin her iki parental allelinin de kaybedilmesinin kansere neden olabileceğini öne sürdü (91). 1990'da Fearon ve Vogelstein ise TSG'lerin kaybedilmesi veya onkogenlerin aktivasyonunun hücrel dönüşüme neden olabileceğini ve bu tür genetik değişikliklerin birikerek kansere dönüşen hücrelerin seçici bir büyüme avantajına sahip olabileceğini ileri sürdü (92).

Yaşa özgü baş- boyun kanseri insidansına dayanan istatistiksel analiz, kanserin 6-10 bağımsız genetik olay biriktikten sonra ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu kavramları benimseyen gelişim mekanizması, klonlama ile popülasyonlarda elde edilen genetik değişiklikleri izleyerek ve daha sonra bu genetik değişiklikleri hiperplaziden displazi, in situ karsinom ve nihayet invaziv karsinomla ilişkilendirerek oluşturulabilir.

Moleküler değişiklikleri izlemek için kullanılabilen teknikler, sitogenetik, heterozigotluk kaybı (LOH), mutasyon analizi ve daha yakın zamanda gen ekspresyon profillemeye tekniklerini içerir (66).

1996'da Califano ve ark. (93), LOH ve FISH analizi kullanılarak zamanla elde edilen genetik değişiklikleri izleyerek, hiperplaziden displaziye, karsinomdan in situ ve invaziv karsinoma kadar olan histolojik ilerleme ile korele bir gelişim mekanizması önerdi (Şekil 2-3).

Hiperplazi gibi premalin lezyonların %30'unda kromozom 9p21 kaybı olduğu ve bu bölgenin kaybının erken bir olay olduğu gösterildi. Bu lokusta Rb proteininin (pRb) fosforilasyonunu inhibe ederek hücre döngüsünün G1 kontrol noktasından S fazına ilerlemesini engelleyen önemli bir TSG olan *p16 (CDKN2A/MTS1)*'nin kodlandığı bulunmuştur.

Diğer bir premalin lezyon olan displazide meydana gelen genetik değişiklikler 3p21 ve 17p13 kaybı olarak gösterildi. Bu lokus; DNA tamiri, hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptozda önemli bir düzenleyici rol oynayan *p53*'ü içermektedir.

Kanser hücrelerinde ise 13q21 ve 14q32 kaybı ve 11q3 amplifikasyonu gözlemlenmiştir. pRb kromozomun 13q21 bölgesinde bulunur ve hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eder. *SiklinD (PRAD1)*, 11q3 lokusuna lokalizedir ve bu genin aşırı ekspresyonu, fosforilasyona ve dolayısıyla pRb'nin aktivasyonuna neden olur.

Genetik farklılığa neden olan bir diğer değişim, heterozigotluk kaybı, invaziv karsinomların 6p, 8p, 4p27 ve 10q12'da lokuslarında bulundu (92). Bunun ardından yapılan çoklu çalışmalarda, baş ve boyun kanserlerinde 3p, 5q, 8p, 9p, 13p, 18q ve 21q'da meydana gelen kromozomal kayıpların meydana geldiği bulunmuştur (93- 96).

3p ve 9p'de meydana gelen kayıplar kanser oluşum riskini 3,8 kat artırırken; 4q, 8p, 11q veya 17p gibi ek kayıplar riski 33 kat arttırdığı bulunmuştur (96, 97). Bu nedenle, 3p veya 9p'de LOH bulunan hastalar kanser gelişim riski taşır ve ek kromozom lokus kayıplarıyla birlikte görel riskleri artar. Örneğin, diğer kromozomal kollarda ek bir kayıp ile 3p veya 9p'de LOH bulunan hastaların lezyonlarında daha agresif bir tedaviye ihtiyaç duyabilirken, sadece 3p veya 9p LOH'li hastalarda kapsamlı bir tedavi yerine, hasta takibi yeterli olabilir (66).

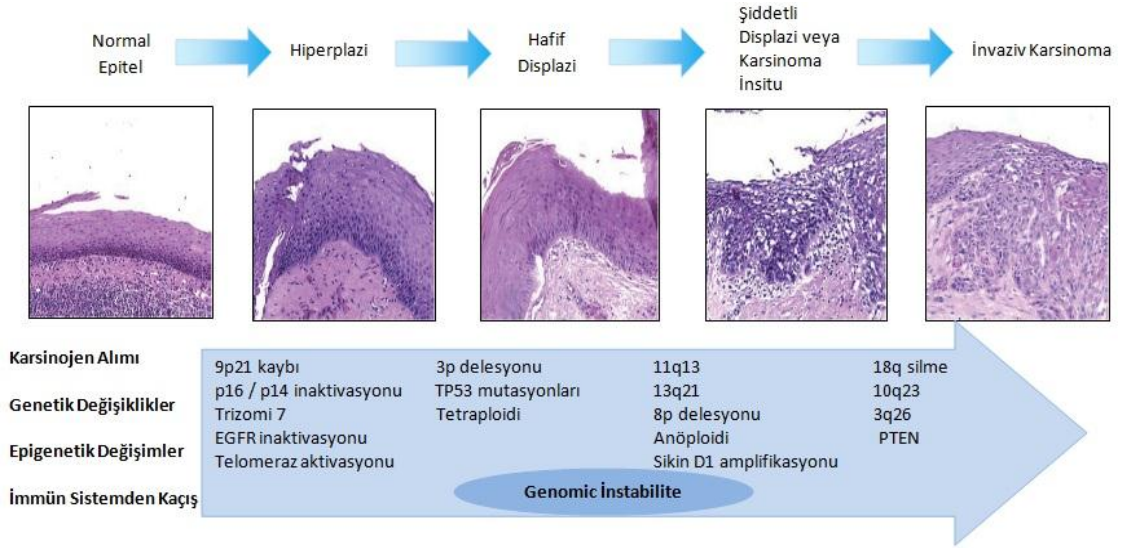
Larenks kanseri, baş ve boyun bölgesinin diğer bölümlerine kıyasla belirli bir *p53* mutasyonu modeline sahiptir. Baş-boyun kanserlerinin çoğunda, 5 ile 8 arasındaki ekzonlar değişirken, larenks kanserinde, mutasyonlar ekson 5'de, özellikle S2 protein alanı ve kodon 248'de kümelenme eğilimindedir (98). Buna bağlı olarak gelişmekte olan bir terapötik strateji, yabancı tip *p53*'ün hücre içinde yabancı tip *p53*'ün fonksiyonunu yerine getirmek için displastik veya kanserli hücrelere verilmesidir. Bu yaklaşım, larenks kanser modelinde yabancı tip *p53* (*Ad5CMV-p53*) sağlayan bir rekombinant adenovirüs kullanılarak araştırılmaktadır (99).

Glutasyon S-transferazı (*GSTM*) kodlayan genlerde bazı genetik polimorfizmlerin, larenks kanser riski ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (100). Jahnke ve ark. tarafından 269 hasta ve 216 kontrolde heterozigot *GSTM1 A/B* ve homozigot *GSTM3* allellerinde meydana gelen polimorfizmlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu; ortaya çıkan fenotipik ve genotipik verilerin larenks kanseri için genetik yatkınlık fikrini desteklediği bulunmuştur (101). Yapılan bir diğer vaka-kontrol çalışmasında, *ERCC5*, *ERCC6* ve *RAD23B* gibi nükleotid eksizyon tamir (NER) genlerinde tek nükleotid polimorfizmleri araştırılmış ve larenks kanseri riskini artırabileceği değiştirilebilir (102)

Nokta mutasyonları, delesyonlar ve translokasyonlar gibi genetik fonksiyon kaybı, TSG'lerin sessizleşmesi ile ilgili ilk tespit edilen araçlardan biridir. Bununla birlikte, gen sessizleşmesinin, TSG'lerin promoter bölgelerindeki CpG adalarında DNA hipermetilasyonu gibi genomun epigenetik değişiklikleri ile de oluşabileceği bulunmuştur.

9p21 kromozomunda yer alan *p16* geninin, promoter bölgesinde meydana gelen hipermetilasyon nedeniyle sessizleşmiş olduğu bulunmuştur. Bu lokusla ilgili yapılan genetik analizler hastaların %67'sinde *p16* lokusunun homozigot delesyona uğradığı ve %21'inde hipermetile olduğu bulunmuştur (103). 14 baş-boyun kanser hücre hattı ile yapılan başka bir çalışmada ise *p16* geninin %29 oranında hipermetile olduğu ve %21'inde homozigot delesyonların olduğu tespit edilmiştir. Larenks kanserli hastalar ile baş-boyun kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda paralel sonuçlar bulunmuştur. Erken evre larenks kanseri tanısı konan 33 hastayı kapsayan bir çalışmada, farenjiyofagial örneklerin % 42'sinde *p16* hipermetilasyonu saptanmıştır. *UT5085* tetranükleotid

mikrosatellit kararsızlığı ile bu sonuçlar birleştirildiğinde, genetik ve epigenetik değişikliklerin bu kombinasyonu, tümörlerin %76'sında gözlenmiştir (104).



Şekil 2-3: Larenks kanserinin gelişim mekanizmasını temsil eden güncel model

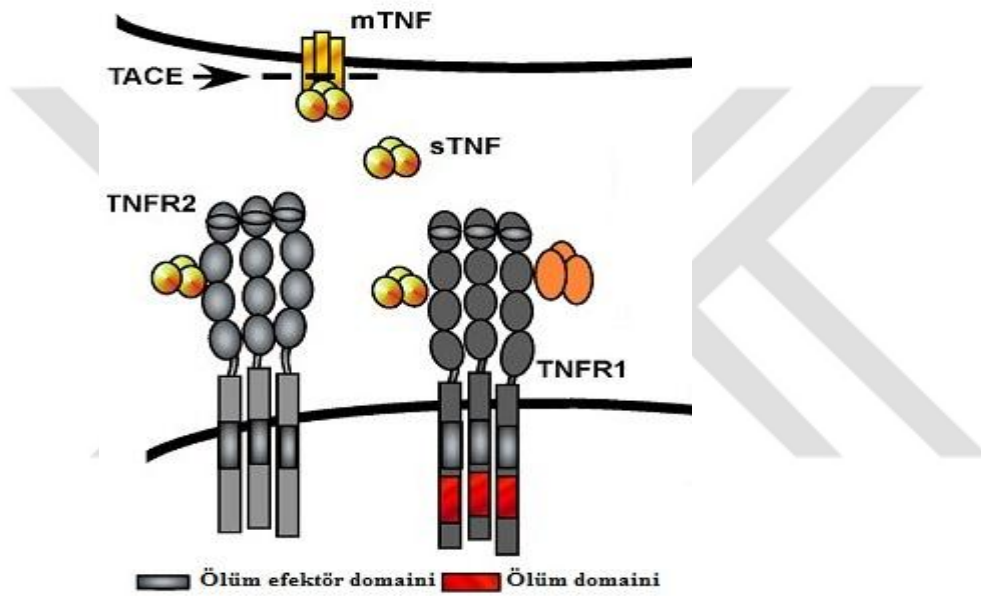
2.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNFA)

Carswell ve arkadaşları tarafından 1975 yılında ilk kez serumda var olan ve in vitro tümörlerin nekrozuna neden olan bir endotoksin uyarım molekülü olarak keşfedilmiştir (105). *Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNFA)* olarak adlandırılan, birçok tümör hücre hattı üzerinde belirgin sitotoksiste gösterebilen ve fare tümör modellerinde tümörde nekroza neden olduğu bulunan bağışıklık sistemi tarafından aktive edilerek üretilen proinflamatuvar sitokin olarak tanımlanmıştır (106).

TNFA geni 6. kromozomda yer alan major histokompatibilite kompleks sınıf-III gen bölgesi içinde yer alır (15). *TNFA* esas olarak kararlı homotrimerlerde düzenlenmiş bir tip II transmembran protein olarak üretilir (Şekil 2-4) (107).

TNFA hem çözünebilir formda hem de hücre zarına bağlı formda bulunabilir. Hücrelerin yüzeyinde ifade edilen transmembran protein olarak membran TNFA, bir metalloproteaz olan, TNFA dönüştürücü enzim (TACE) ile membrandan ayrılır (108, 109). Bu, 17 KDa trimerik çözünebilir sitokin olan çözünebilir TNFA (sTNF)'yı serbest bırakır. Bu, kan plazmasında bulunan, yani vücutta dolaşan ve sentez alanından uzaktaki fizyolojik alanlarda hareket edebilme yeteneği bulunan TNFA'yı güçlü bir

endokrin fonksiyonu kazandıran formda bulunan TNFA formudur (110). Hem çözünen hem de membrana bağlı TNFA, iki transmembran reseptör molekülüne bağlanır: TNF reseptör 1 (TNFR1) -ölüm domaini içeren proteindir- ve TNFA reseptörü 2 (TNFR2) (111). Membran TNFA, TNFR2 için daha güçlü bir ligandır (112). Hemen hemen tüm hücre tiplerinde ifade edilen TNFR1 ve normal fizyolojik koşullar altında (immün) bağışıklık sistemindeki hücrelerde düşük seviyelerde eksprese edilen TNFR2 vasıtasıyla geniş bir biyolojik etki serisi uygular (113-115).



Şekil 2-4:TNFA ligand ve reseptörleri

TNFA çoğunlukla aktif makrofajlar ve monositler tarafından salınmaktadır. Ancak aktif T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler, mast hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, kupfer hücreleri, düz kas hücreleri, bazofiller gibi çeşitli hücrelerde de sentezlenebilir (116- 118).

TNFA'nın pleiotropik etkileri, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi proliferatif yanıtlardan inflamatuvar etkilere ve immün yanıtlara aracılık edilmesinden apoptotik ve nekrotik hücre ölüm mekanizmaları gibi yıkıcı hücresel sonuçlara kadar değişiklik gösterir (117). *TNFA*'nın sentez ve salınımını başlatan başlıca uyarılar; gram-negatif bakteriler tarafından üretilen lipopolisakaritler, gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı

yapısal bileşenleri (peptidoglikan ve teikoik asitler), kapsül antijenleri ve ekzotoksinler, mantarların hücre duvarı antijenleri, viral ve parazit antijenleridir (119- 121).

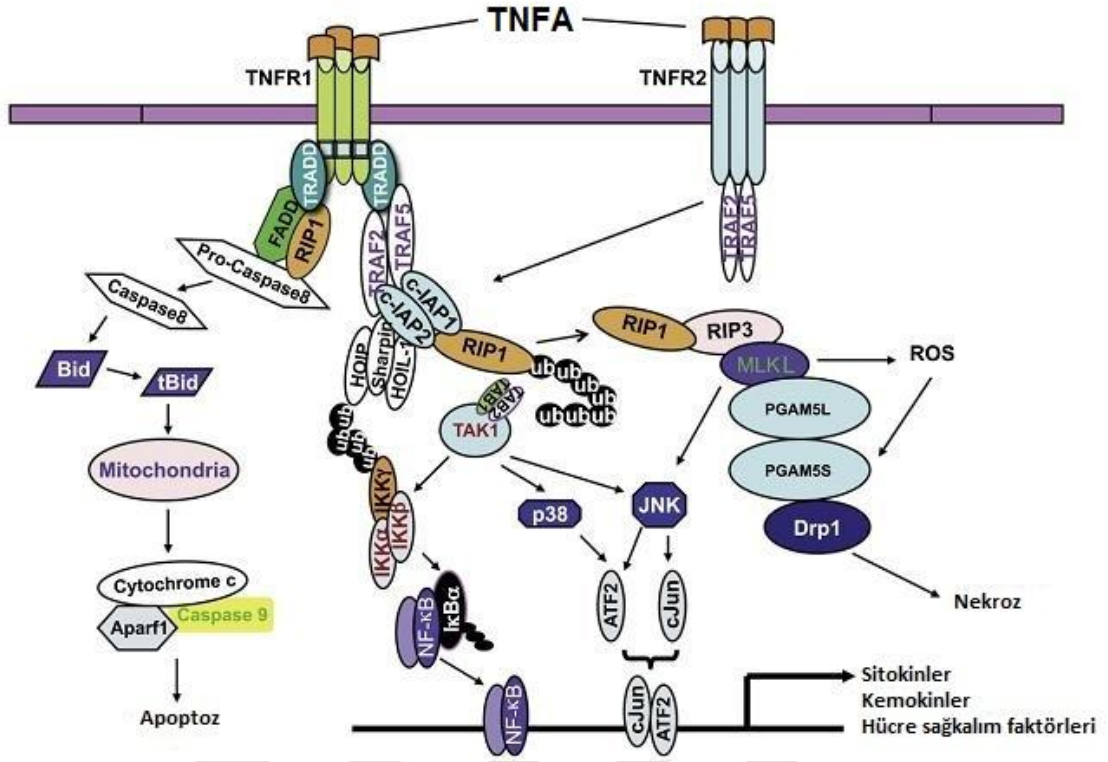
TNFA mRNA üretimi, transkripsiyonel olarak *TNFA* geninin promotör bölgesi içindeki transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin varlığı ile düzenlenir, nükleer faktör-kB (NF-kB), c-Jun, aktivatör protein-1 (AP1) ve aktif T hücreleriyle ilişkili çekirdek faktör (NFAT) tarafından indüklenir (122).

2.4.1. *TNFA* Sinyal İletimi

TNFA, TNFA reseptörünün trimerizasyonunu tetiklemektedir. Bu işlem adaptör moleküllerin reseptör kompleksine çekerek bağlanmasını sağlar. *TNFA*'nın aktive ettiği yollardan biri kaspaz 8 aracılığıyla apoptoz oluşumuna yol açar (123).

TNFR ailesinin üyeleri hücre dışı alanlarında bir ile altı arasında sistein açısından zengin tekrarlar içerir ve tipik olarak her birinde üç sistein köprüsü bulunmaktadır. TNFR1 ve TNFR2'nin her biri, hücre dışı alanlarında dört sistein açısından zengin tekrar içerir ve üç protomerinin her ikisi arasında oluşan üçlü ligandın yanal oluklarıyla etkileşime giren uzunlamasına şekiller oluştururlar (124, 125).

TNFR1, TNFA'nın indüklediği sinyal yollarının temel aracısı olarak görev yapmaktadır. TNFR1 sinyali, her ikisi de hücresel çevreye bağlı olan, nükleer faktör kappa B (NF-kB) aktivasyonu ve apoptozun indüklenmesi gibi pleiotropik fonksiyonlara sahiptir. Bununla birlikte, TNFR2'nin ifadesi, TNFR1 ile karşılaştırıldığında spesifik hücre türleriyle sınırlıdır.



Şekil 2-5: TNFA sinyal yolları

Geniş bir araştırma grubu, *TNFA*'nın iki reseptörü aracılığıyla çok sayıda biyolojik fonksiyon kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. İmmün yanıtın başlatılmasında öncelikli olarak TNFR1'in sorumlu olduğu gösterilmiştir (126, 127)

TNFR1 ekstraselüler bölgesinde iyi tanımlanmış üç adet sisteince zengin domain içerir (128). Reseptörün intraselüler bölgesi ölüm domaini olarak adlandırılır ve protein-protein etkileşim bölgesi içerir (129). TNFR1'e ligand bağlandıktan sonra intraselüler ölüm domaininden, ölüm domaini sessizleştiricisi ayrılır (Şekil 2-5). Bunun üzerine adaptör protein TNFA reseptör ilişkili ölüm domaini (TRADD), reseptörün ölüm domainine bağlanır (130). TRADD, daha sonra, aşağı yönlü sinyal oluşumu ile ilgili diğer proteinleri, TNFA reseptör ilişkili faktör-2 (TRAF2) ve TNFA reseptör ilişkili faktör-5 (TRAF5)'i bağlar. TNFA-TNFR1 sinyal kompleksi (kompleks I) hızla NF-κB ve c-Jun N-terminal kinaz(JNK)/SAPK aktivasyonuna yol açan sinyalizasyon kaskadlarını başlatır (131- 134).

TNFR1 aracılığıyla NFκB aktivasyonu için TRAF2 ve TRAF5, apoptozun hücrel inhibitörü-1/2 (cIAP1/2), Ubc13 ubikitin konjuge proteinleri ile TRADD ve

RIP1 birbirleriyle ilişkilidir. Poliübikütinlenmiş RIP1, MEKK3 ve TAK1/TAB2 kompleksinin katalitik IκB kinaz (IKK) kompleksini aktive etmesiyle NF-κB inhibitörü olan kappaB-alfa inhibitörü (IκBa) fosforile olur. Fosfo-IκBa daha sonra ubiquitin-proteazom yolağı ile parçalanır. Bu sayede NF-κB nükleusa girer ve transkripsiyonun başlamasını sağlar (135, 136). Poliübikütinlenmiş RIP1/TAK1 kompleksinin etkileşimi yoluyla alternatif olarak IKK kompleksi aktif hale gelebilir (135- 137). NF-κB'nin etkinleştirilmesi, çekirdeğe transloke olmasını sağlar ve burada c-IAP1, c-IAP2, kaspaz-8 homologu FLICE inhibitör proteini, *TRAF1* ve *TRAF2* gibi anti-apoptotik hedef genlerin transkripsiyonunu başlatabilir (Şekil 1) (138).

TNFR1'den farklı olarak, TNFR2 bir ölüm domainine sahip değildir ve uzun süren bir NF-κB aktivasyonuna neden olur (139). NF-κB'nin TNFR2 aktivasyonunun TNFR1 sinyal yolağından bağımsız olarak meydana geldiği gösterilmiştir (140).

TNFA'nın sadece in vitro değil in vivo tümör büyümesini kontrol ettiği de gösterilmiştir (141- 143). *TNFA* ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, monositten ifade edilen *TNFA*'nın seçici tümör sitotoksitesine sahip olduğunu göstermiştir (144).

Normal hücre fonksiyonları sırasında olumlu şekilde ortaya çıkan klasik NF-κB yolunun ve RIP1'in ubiquitinasyona uğraması, *TNFA*'nın indüklediği apoptozu engeller (145,146). Bununla birlikte, c-IAP engelleyici proteinine erişilebilirliğin yetersiz olduğu durumlarda, kompleks II, kaspaz-8 aktivasyonunu ve apoptotik hücre ölümünü tetikler (147). TRADD ve RIP, TNFR1 sinyal kompleksinden serbest bırakıldıktan sonra, sitoplazmik kompleksi (kompleks II) oluşturan FADD ve TRAF1 proteinlerinden oluşan "ölüm sinyali indükleyen sinyalleme kompleksi (DISC)" proteinlerinin bağlanmasına izin verir (148-150). Bu proteinler, başlatıcı kaspaz, prokaspaz-8 gibi ek proteinlerin proteolitik olarak bölündüğünde aktif bir kaspaz-8 formunu serbest bırakırlar (151). Serbest bırakılmış aktif kaspaz-8 daha sonra prokaspaz-3, -6, -7 ve diğer sitozolik substratları enzimatik olarak işler ve bu prokaspazları aktif enzimlere dönüştürür (152). Kaspaz-3'ün aktivasyonu, özellikle *TNFA*'nin indüklediği hücre ölümü için gereklidir, genomik DNA'yı parçalayan latent DNaz'ları, kaspaz aktif DNaz(CAD)'ları, hedefleyerek apoptotik hücre ölümüne neden olur.

Kaspaz 8'in proteaz aktivitesi negatif inhibitör protein FLICE/ kaspaz-8 inhibitör protein (cFLIP) tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. cFLIP ölüm domainini

kaybetmiştir ancak ölüm etkileyici domain (DED) içerir. Bu domain prokaspaz 8 ve DED içeren diğer proteinler ile etkileşimine izin verir. Böylece TNFR1 DISC'e yapısal prokaspaz-8 alımını önler. Apoptoz protein inhibitörleri (IAP'ler) hücre ölümünü indükleyen TNFR'nin önemli düzenleyicileridir. IAP'ler, TRAF2 ile doğrudan etkileşim yoluyla hareket eder (138, 153). Bu nedenle, *TNFA*'nın TNFR1 ile etkileşimi cFLIP ve IAP'ler tarafından kritik olarak düzenlenen kaspaz bağımlı hücre ölüm yolağını indükler. Bir çeşit sapma veya hücre döngüsünün inhibisyonu, protein sentezi veya değişmiş hücre metabolizması olmadığı sürece *TNFA* tarafından indüklenen hücre ölümü meydana gelmez (154, 155).

2.4.2. *TNFA* ve Kanser İlişkisi

TNFA, apoptotik hücre ölümünün güçlü bir indükleyicisidir, fakat başlangıçta belirtildiği üzere, genellikle (normal primer memeli hücrelerinde değil) sadece transformasyona uğramış hücrelerde (kanser hücreleri), virüsle enfekte olmuş hücrelerde, biyokimyasal olarak dengesiz veya stres altındaki hücrelerde meydana gelir. (156). *TNFA* gen promoter metilasyonu ve buna bağlı ekspresyon seviyesindeki azalış ile malin melanoma (157), kolorektal kanser (22), prostat (23, 158) ve meme (159) kanseri arasındaki ilişki inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *TNFA* geninde metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve bunun kanser oluşumunda rol oynayabileceği belirtilmiştir.

TNFA gen polimorfizmleri çeşitli kanserlere yatkınlıkla ilişkilidir. *TNFA* gen polimorfizmleri Non-Hodgkin lenfomada (21), meme (17), mide (18), kolorektal kanserinde (20) ve prostat tümörlerinde (19) incelenmiş, özellikle promoter bölgede dönüşümü yüksek *TNFA* üretimi ile ilişkili bulunmuştur. Promoter bölgede en sık rastlanan polimorfizmler c.-238G>A, c.-308G>A, c.-857C>T, c.-863C>A ve c.-1031T>C tek nükleotid değişiklikleridir ve bu polimorfizmlerin çeşitli kanserlere yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (160-164). c.-806C>T de *TNFA* geninin promoter bölgesinde meydana gelen tek nükleotit değişikliğidir ancak bu polimorfizmin hastalık riskiyle ilişkisi henüz bilinmemektedir (160).

2.4.3. Anti-*TNFA* Tedavisinin Kanser ile İlişkisi

TNFA'nın tümör oluşumundaki bahsedilen rolüne dayanılarak anti-*TNFA* tedavinin kanser tedavisinde etkili olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır. Uygun hastada ve uygun hastalıkta, kurallara uygun şekilde ve yakın takip altında kullanıldıkları

sürece, anti-TNFA ajanlar oldukça etkili ilaçlardır. Direkt bir antikanser aktivitesi gösterilememiş olmasına rağmen, anti-TNFA tedavi miyelom ve akut miyeloid lösemi gibi bazı hematolojik kanserlerde tedavi amacıyla kullanılmıştır. Bazı solid tümörlerde tedavi amacıyla kullanılan anti-TNFA tedavinin etkili olmadığı ortaya konmuştur. Anti-TNFA tedavisi sonrası lenfoma izlenen bir olgu anti-TNFA tedavisi ve kanser arasındaki ilişki araştırma konusu olmuştur. Bu ilaçların kanser yapıcı etkisi yoktur, fakat ailesinde kanser hastaları olan veya geçmişinde kanser tanısı olan veya bunlar dışında da kansere yatkınlığı olan hastalara anti-TNFA ajanların mümkün olduğunca verilmemesi önerilmektedir. Bununla birlikte, devam eden klinik çalışmalarda bazı solid tümörlerde anti-TNFA tedavinin etkinliği halen araştırılmaktadır.

Günümüzde klinik kullanım ruhsatı bulunan 5 anti-TNFA ajanı bulunmaktadır. Bunlar; Infliksimab, etanersept, adalimumab, golimumab ve sertolizumab pegol'dür. Anti-TNFA ilaçlar genel anlamda anti-inflamatuar etkilerini *TNFA*'yı antagonize ederek göstermelerine karşın, kimyasal yapıları ve fizyolojik özelliklerine bağlı olarak immün sistem ve inflamasyon üzerinde farklı etkileri de vardır. Bu etkiler ilaçların hem klinik endikasyonlarını hem de yan etki profillerini belirlemektedir. Diğer tüm ilaçlarda olduğu gibi bu ajanlarda da etkinliğin yanı sıra yan etkiler de önemli bir konudur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

Çalışma, insan doku, kan ve tükürük örnekleri üzerinde yapılacak olduğundan İstanbul Üniversitesi İTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvurusu yapılmış olup, 27/11/2015 tarih ve 20 sayılı toplantısında çıkan karara göre etik açıdan uygun bulunmuştur.

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran gönüllü onamları alındıktan sonra hekimlerce zaten hastalıkları sebebiyle ameliyatlarına karar verilen larenks kanseri tanısı almış 50 hastadan (yaş ortalaması: $59 \pm 7,57$) ameliyat öncesinde serum (7-10 cc) ve tükürük (20mL) örnekleri ile ameliyat sırasında 0,5 cm büyüklüğünde tümör ve eşlenik normal doku örnekleri toplandı. Ayrıca çalışmamızda sağlıklı kontrol olarak kendisi ve ailesinde benign veya malign hikayesi bulunmayan, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvurmuş horlama cerrahisi [uvulopalatopharyngoplasty (UPPP)] uygulanmasına zaten hekimlerce karar verilmiş 20 sağlıklı bireye (yaş ortalaması: $44 \pm 8,1$) ait ameliyat sırasında 0,5 cm normal doku, ameliyat öncesinde serum (7-10 cc) ve tükürük (20mL) örnekleri toplanmıştır. Çalışmanın tamamında İ.Ü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda bulunan laboratuvar ve cihazlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Ultra Derin Dondurucu (-80 °C)/ Sanyo

Derin Dondurucu (-20 °C)/ Sanyo

El homojenizatörü/ Qiagen

Mikropipetler/ Thermo

Vorteks/ Snijders

Santrifüjler/ Heraeus, Hettich, Jouan

Etüv/ Hereaus

Hassas Teraziler/ Chyo

Nanodrop Spektrofotometre/ Thermo Scientific

Termal Cyclers/ Techne

Elektroforez Sistemleri/ BRL, BioRad,CBS Scientific Co.

Jel Dökümentasyon Sistemi/ Vilber- Lourmat

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

İzotonik(%0,9 Sodyum klorür)

PBS

Ficoll

Proteinaz K

Ribonükleaz A

Fenol

Kloroform

İzopropanol

Tris

Sodyum Dodesil Sülfat

Taq Polimeraz

MspI (10 U/ μ L)

HpaII (10 U/ μ L)

NcoI (10 U/ μ L)

MnII (10 U/ μ L)

TaeI (10 U/ μ L)

BamHI (10 U/ μ L)

BbsI (10 U/ μ L)

dNTP

Etanol

DMSO

Agaroz

Orange G/ SSCP Loading Dye

Magnezyum Klorür

Etidyum Bromür

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Karışımlar

Parçalama Tamponu (1lt):	155 mM NH ₄ Cl
	10 mM KHCO ₃
	0.1 mM EDTA (pH: 8.0)
SE Tamponu (1 L):	75 mM NaCl
	25 mM EDTA
	30 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
TE Tamponu (1 L):	20 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
	1 mM EDTA (pH: 8.0)
Fenol için TE Tamponu (0,5 mL):	0.25 mM Tris (pH:8.0)
	0, 5 mM EDTA (pH:8.0)
Fenol/Kloroform/İsopropanol:	(1:1):1(Fenol/Kloroform)/İsopropanol
Proteinaz K:	20 mg / ml
Ribonükleaz A:	10 mg / ml
SDS (%10; pH:7.2) (1 L):	100 g sodyumdodesilsülfat
MspI,HpaII ve NcoI enzimi için Tango Buffer:	33 mM Tris-Asetat (7,9)
	10 mM Magnezyum-Asetat
	66 mM Potasyum-Asetat
	0,1 mg/mL BSA
TaiI enzimi için Buffer R:	10 mM Tris-HCl(pH 8,5)
	10 mM MgCl ₂
	100 mM KCl

	0,1 mg/mL BSA
BbsI ve MnlI enzimi için Buffer G:	10 mM Tris-HCl(pH 7,5)
	10 mM MgCl ₂
	50 mM NaCl
	0,1 mg/mL BSA
NcoI enzimi için BamHI Tamponu:	10 mM Tris-HCl(pH 8,0)
	5 mM MgCl ₂
	100 mM KCl
	%0,02 Triton X-100
	0,1 mg/mL BSA
%15'lik PAGE(20 mL)	7,5 mL Akrilamit-Biakrilamit(19:1)
	9,5 mL dH ₂ O
	2 mL %99,5'lik Gliserol
	1 mL 10X TEB
	40 µL TEMED
	400 µL APS
%2,5'luk Agaroz Jel	2,5 g Agaroz
	100 mL 0,5X TEB
	0,5 µg Etidyum Bromür
Orange G Yükleme Tamponu	3 mL %10 Orange G
	15 g Ficoll-400

3.1.5. Restriksiyon Enzimleri ile Tanıma Bölgeleri

Polimorfizm ve metilasyon deneylerinde kullanılan restriksiyon enzimleri ile spesifik enzim kesim bölgeleri sırasıyla Tablo 3-1 ve Tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Polimorfizm deneylerinde kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri

Polimorfizm	Nükleotit Değişimi	Restriksiyon enzim İnkübasyon sıcaklığı (°c)	Kesim Bölgesi
c.-1031T>C (NM_000594.3:c.-1211T>C, rs1799964)	T>C	Bbs I, 37	5'...GAAGAC(N) ₂ ▼...3' 3'...CTTCTG(N) ₆ ▲...5'
c.-863C>A (NM_000594.3:c.-1043C>A, rs1800630)	C>A	Tai I, 65	5'... ACGT▼...3' 3'...▲TGCA ...5'
c.-857C>T (NM_000594.3:c.-1037C>T, rs1799724)	C>T	Tai I, 65	5'... ACGT▼...3' 3'...▲TGCA ...5'
c.-806C>T (NM_000594.3:c.-986C>T)	C>T	Nml I, 37	5'...CCTC(N) ₇ ▼...3' 3'...GGAG(N) ₆ ▲...5'
c.-308G>A (NM_000594.3:c.-488G>A, rs1800629)	G>A	Nco I, 37	5'...C▼CATG G...3' 3'... G GTAC▲C...5'
c.-238G>A (NM_000594.3:c.-418G>A, rs361525)	G>A	Bam HI, 37	5'...G▼GATC C...3' 3'... C CTAG▲G...5'

Tablo 3-2: Metilasyon deneylerinde kullanılan restriksiyon enzimleri ve özellikleri

Restriksiyon enzim	Kesim Bölgesi
MspI (HpaII)	5'...C▼CG G...3' 3'... G GC▲C...5'
HpaII	5'...C▼CG G...3' 3'... G GC▲C...5'

3.2. Yöntem

3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi

3.2.1.1. Doku Eldesi

Larenks kanseri tanısı almış olan 50 hastanın 0,5 cm çaplarında primer tümör ve eşlenik normal doku örneği ile malignite dışı sebeple uvulopalatofaringoplasti (UPPP) tekniği uygulanan 20 sağlıklı bireyden 0,5 cm çapında normal mukoza örneği alındı. Doku örnekleri soğuk zincir yöntemiyle laboratuvara getirildi ve DNA/RNA izolasyon işlemlerine kadar ultra derin dondurucuda saklandı.

3.2.1.2. Serum Eldesi

Larenks kanserli hastalar ile sağlıklı bireylerden ameliyat öncesinde 7-10 cc periferik kan örneği kuru tüplere alınarak soğuk zincir yöntemi ile laboratuvara teslim edildi. Kuru Tüpte bulunan kan 1950 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek faz ayrımı

sağlandı. En üstte kalan serumun bulunduğu sarı faz kriyo tüplere 1'er mL olacak şekilde dağıtılarak gerekli etiketlemeler yapıldıktan sonra ultra derin donduruculara DNA/RNA izolasyon işlemlerine kadar saklandı.

3.2.1.3. Tükürük Eldesi

Hasta ve sağlıklı bireyler, hekimler tarafından operasyondan yaklaşık 1 saat öncesine kadar katı ve sıvı besin almamaları, ağız hijyenlerini sağlamaları konusunda bilgilendirilmiştir. Tükürük örnekleri toplanırken; ağız içi 1 dk boyunca suyla çalkalanarak temizlendi, ağız içinde biriken tükürük 5 dk boyunca biriktirildi ve özellikle larenks bölgesine gelecek şekilde garagara yaptırılarak hekimin vermiş olduğu kaptaki toplandı. Tükürük toplama işlemi yarım saat içinde yapılarak laboratuvara teslim edildi.

Laboratuvara teslim edildikten sonra tükürük izotonik ile 1:2 oranında sulandırılarak vortekslendi ve 1950 rpm'de 30 dk santrifüjlendi. Süpernatant pelete zarar gelmeyecek şekilde uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 3mL PBS eklenerek pipetaj yapıldı ve kriyo tüplere 1'er mL olacak şekilde dağıtıldı. Kriyo tüpler 1950 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde atılarak elde edilen pelet ultra derin donduruculara izolasyon işlemlerine kadar saklandı.

3.2.1.4. Lenfosit Eldesi

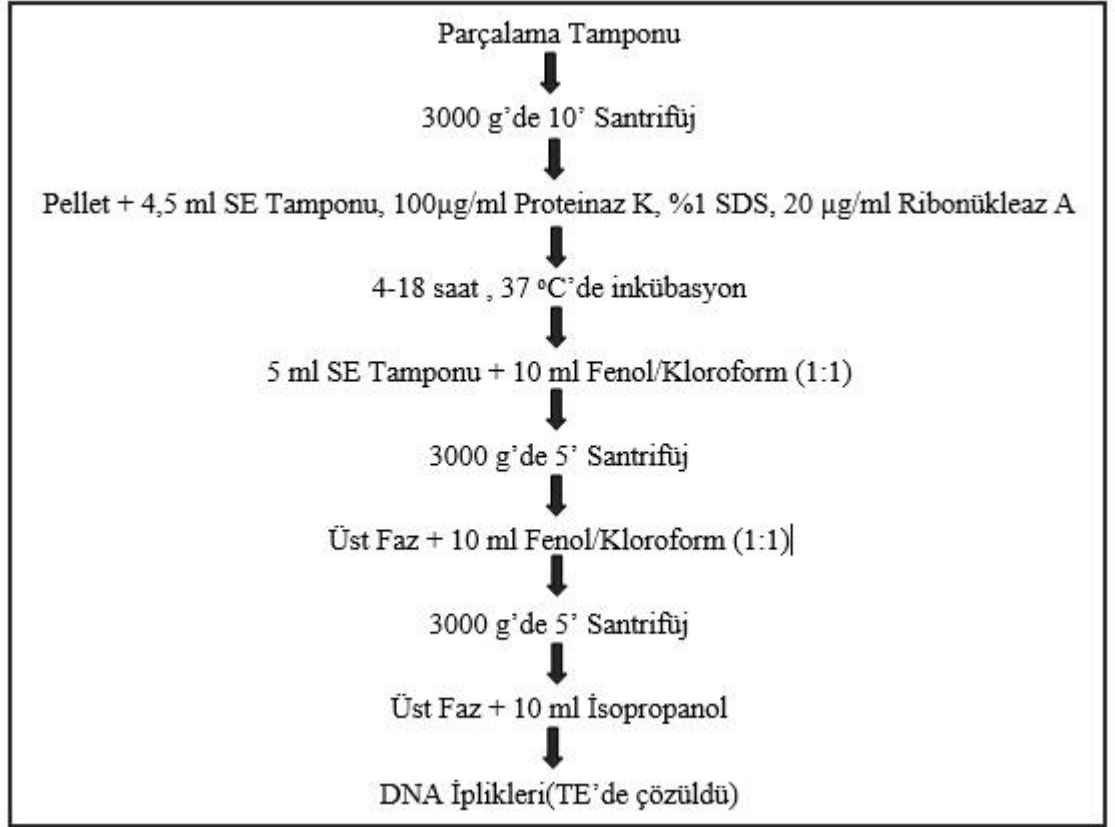
Larenks kanserli hastalar ile sağlıklı bireylerden ameliyat öncesinde 7-10 cc periferik kan örneği EDTA'lı tüplere alınarak soğuk zincir yöntemi ile laboratuvara teslim edildi. Laboratuvara teslim edildikten sonra periferik kan izotonik ile 1:1 oranında sulandırılarak vortekslendi ve 2 mL Ficoll üzerine yavaşça çepere degecek şekilde aktarıldı. 1950 rpm'de 30 dk santrifüjlendikten sonra Ficoll üzerinde oluşan bulutumsu fazı kesik cam pipet yardımıyla yeni bir tüpe aktarıldı. Tüp 10 dk 1950 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant pelete zarar gelmeyecek şekilde uzaklaştırıldı. Pelet üzerine 3mL PBS eklenerek pipetaj yapıldı ve kriyo tüplere 1'er mL olacak şekilde dağıtıldı. Kriyo tüpler 1950 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde atılarak elde edilen pelet ultra derin donduruculara izolasyon işlemlerine kadar saklandı.

3.2.2. DNA İzolasyonu

3.2.2.1. Dokudan DNA Eldesi

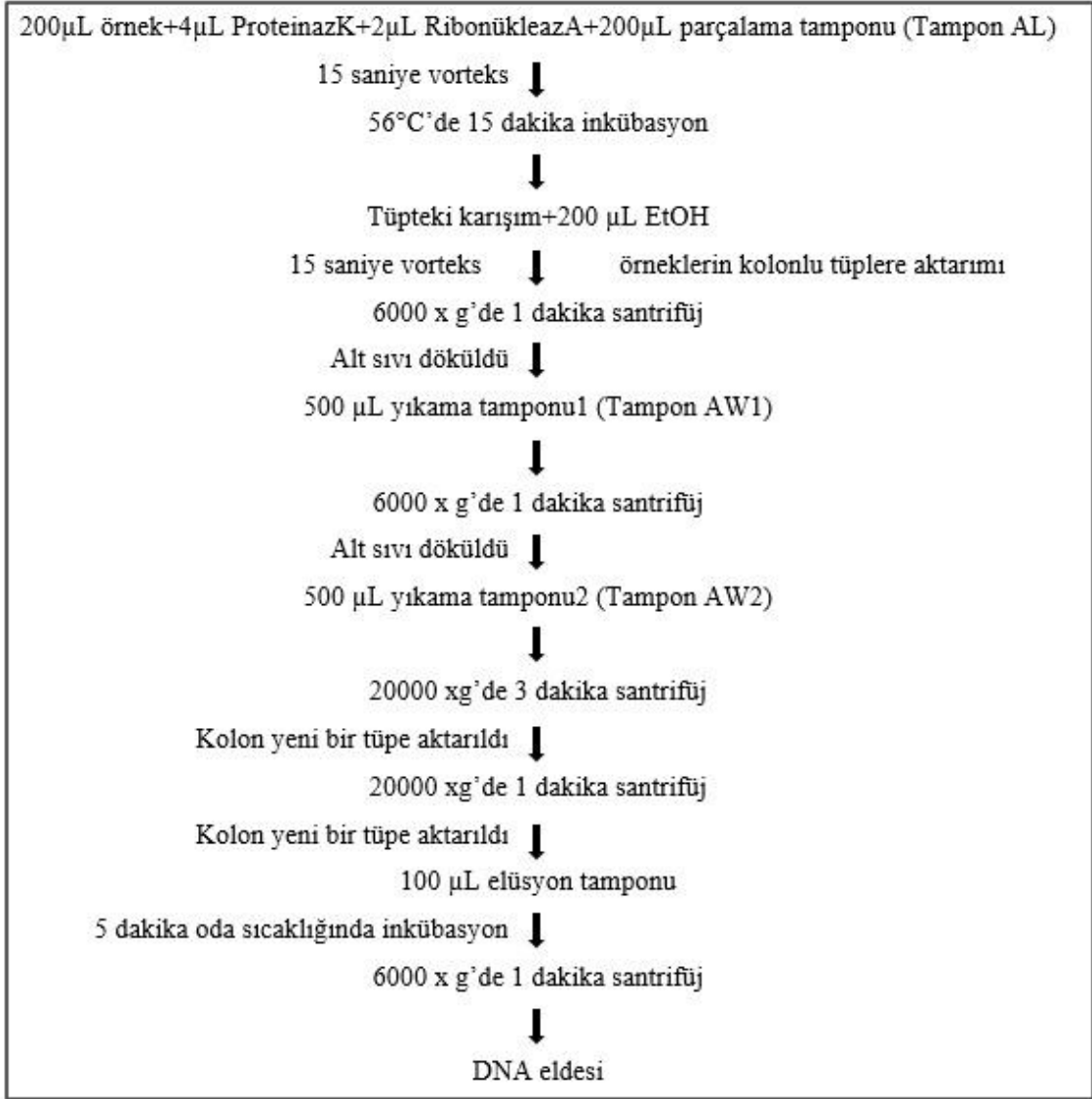
Hastalara ait tümör, eşlenik normal ve sağlıklı bireylere ait normal doku örneklerinin DNA izolasyonu Tablo 3-3'te verilen protokole uygun olarak yapıldı.

Tablo 3-3: Dokudan DNA izolasyonu

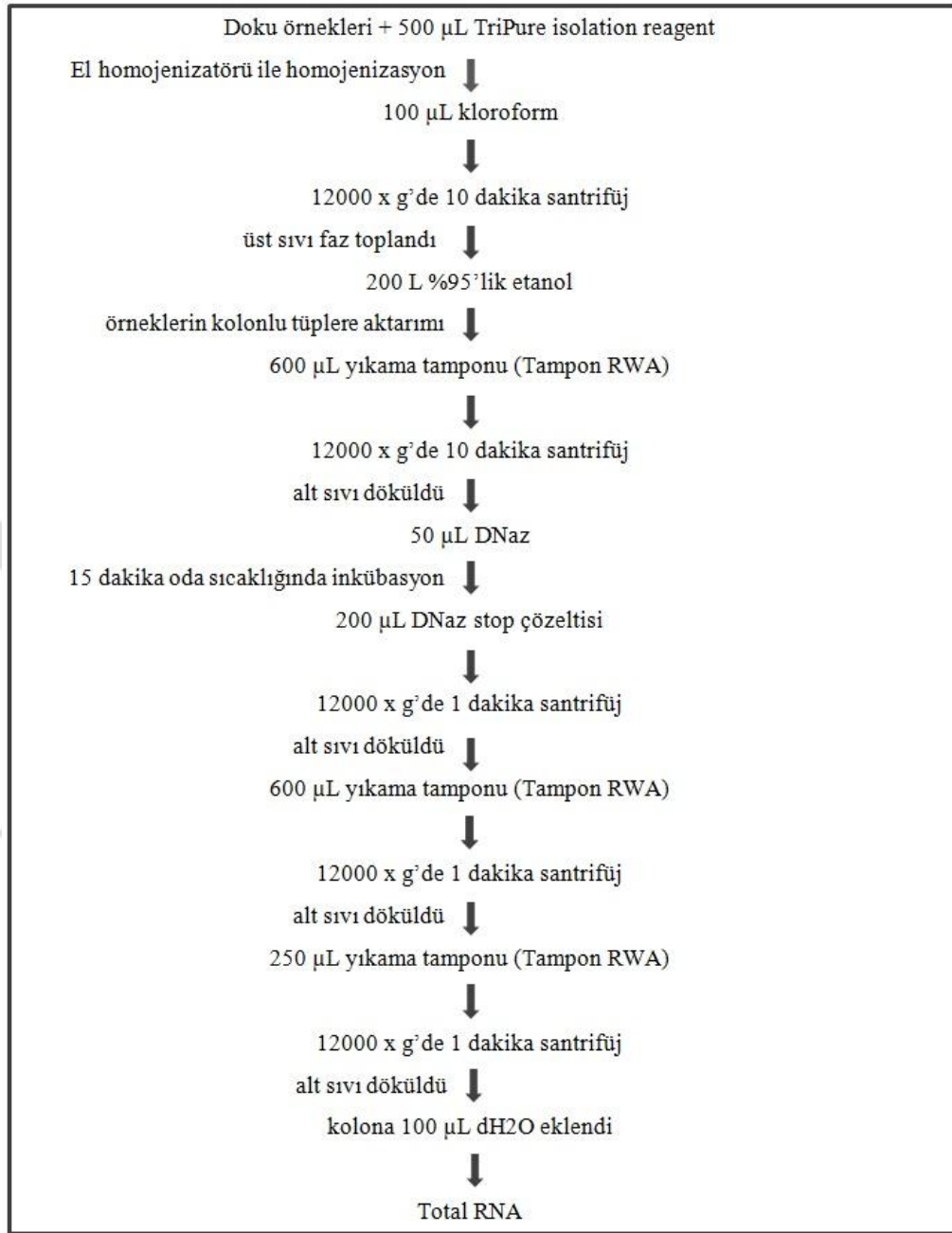


3.2.2.2. Serum, Tükürük ve Lenfosit DNA Eldesi

Hasta ve sağlıklı bireylere ait serum, tükürük ve lenfosit örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Almanya) protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: Serum, tükürük ve lenfositlerden DNA izolasyonu**3.2.3. RNA İzolasyonu**

Hasta ve sağlıklı bireylere ait doku örneklerinden ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere RNA izolasyonu SV Total RNA İzolasyon Kit (Promega, ABD) protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Tablo 3-5)

Tablo 3-5: Dokudan RNA izolasyonu**3.2.4. cDNA Sentezi**

Total RNA izolasyonu sonrası nanodropta RNA'nın saflık ve konsantrasyonu ölçüldü. cDNA reaksiyon karışımı RNA konsantrasyonu 100 ng olacak şekilde hazırlanarak Tablo 3-6'da belirtilen koşullarda cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3-6: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Total RNA (100 ng)	Değişken
dH ₂ O	15 µL – totalRNA hacmi
5x TransAmp Buffer	4 µL
Reverse Transkriptaz	1 µL
Toplam hacim	20 µL
Sıcaklık	Süre
25 °C	10 dakika
42 °C	15 dakika
85 °C	5 dakika

3.2.5. Primer Tasarımı ve Sentezi

TNFA geninin metilasyon ve ekspresyon primerleri internette kullanıma açık olan Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) programı ile tasarlandı. c.-238G>A, c.-308G>A, c.-857C>T, c.-863C>A ve c.-1031T>C polimorfizm deneyleri için primerler Naderi ve ark. (167), c.-806C>T polimorfizm deneyleri için ise Ho ve ark. (160) tarafından tasarlanan primerler kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız primerler Tablo 3-7’de gösterilmiştir.

Tablo 3-7: Metilasyon, ekspresyon ve polimorfizm deneylerinde kullanılan primer dizileri

	Forward Primer(5' – 3')	Reverse Primer(5' – 3')
Metilasyon Primer	ATGAAAGAAGAAGGCCTGCC	AGGGAGAGAAAACGGGGTTG
Ekspresyon Primer	GTAGCCCATGTTGTAGCAAAC	CTCTGATGGCAGAGAGGAG
c.-1031T>C (NM_000594.3:c.-1211T>C, rs1799964)	TATGTGATGGACTACCAGGT'	CCTCTACATGGCCCTGTCTT
c.-863C>A (NM_000594.3:c.-1043C>A, rs1800630)	GGCTCTGAGGAATGGGTTAC	CTACATGGCCCTGTCTTCGTTACG
c.-857C>T (NM_000594.3:c.-1037C>T, rs1799724)	GGCTCTGAGGAATGGGTTAC	CCTCTACATGGCCCTGTCTAC
c.-806C>T (NM_000594.3:c.-986C>T)	GGCTCTGAGGAATGGGTTAC	AACGTCCCTGTATTCCATAC
c.-308G>A (NM_000594.3:c.-488G>A, rs1800629)	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	GGGACACACAAGC ATCAAG
c.-238G>A (NM_000594.3:c.-418G>A, rs361525)	AAACAGACCACAGA CCTGGTC	CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC

3.2.6. Restriksiyon Enzim Kesim Tekniği ile Metilasyon Profilinin Belirlenmesi

50 larenks kanserli hastanın tümör ve eşlenik normal dokusu ile serum, tükürük örnekleri ve 20 sağlıklı bireyin normal dokusu ile serum, tükürük örneklerinden elde edilen DNA, aynı kesim bölgesini tanıyan metilasyona duyarlı HpaII ve metilasyona dirençli MspI restriksiyon enzimleri yardımıyla 37°C’de 16-18 saat inkübasyona

bırakıldı (Tablo 3-8). Enzimlerden HpaII metillenmiş bölgeyi kesmezken MspI aynı bölgeyi kesme özelliğine sahiptir.

Tablo 3-8: Metilasyon deneyinde kullanılan restriksiyon enzim karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek için hacim
1X Restriksiyon Enzim Buffer	2 µL
10U Restriksiyon Enzimi	1 µL
500 ng Genomik DNA	2,5 µL
dH ₂ O	14,5 µL
Toplam Hacim	20 µL

DNA örneklerinin gece boyu inkübasyonundan sonra etanol çöktürme yöntemi kullanılarak DNA örnekleri çöktürüldü. Bunun için enzim kesimi yapılan tüpe 6 µl 3M sodyum asetat (pH: 5,2), 1 µl glikojen ve 180 µl soğuk etanol eklendi. Karışım 30 dakika -80 °C'ye konuldu. Ardından 30 dakika 12000 rpm'de +4°C'de santrifüj yapılarak kesim ürünleri çöktürüldü. Süpernatant atılarak pelet kurutulup üzerine 20-40 µl dH₂O eklendi.

Kesim ürünleri aşağıdaki reaksiyon karışımı kullanılarak uygun primerler yardımıyla çoğaltıldı (Tablo 3-9).

Tablo 3-9: Metilasyon deneyi reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek için hacim
10X PCR Buffer	5 µL
250 µM dNTP karışımı	1 µL
3 mM MgCl ₂	6 µL
0,3 µM Forward Primer	0,5 µL
0,3 µM Reverse Primer	0,5 µL
2U Taq DNA Polimeraz	0,4 µL
100 ng Genomik DNA	2,5 µL
dH ₂ O	31,6 µL
DMSO (%5)	2,5 µL
Toplam Hacim	50 µL

PCR reaksiyon karışımı toplam hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Aşağıdaki koşullar kullanılarak PCR gerçekleştirildi. (Tablo 3-10)

Tablo 3-10: Metilasyon deney koşulları

Reaksiyon Koşulları	Denatürasyon		95°C 10 dk
	Denatürasyon	38 siklus	95°C 1 dk
	Bağlanma		60°C 1 dk
	Uzama		72°C 1 dk
	Soğuma		72°C 10 dk

PCR ürünleri %2,5'lük agaroz jele 13 µl kesim ürünü ve 0,5 µl 10x OrangeG yükleme tamponu olacak şekilde yüklendi.

3.2.7. Semi-Kantitatif Reverse Transkriptaz PCR Tekniği ile Gen Ekspresyon Analizi

TNFA geninin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için öncelikle hastalara ait tümör ve eşlenik normal doku örneği ile sağlıklı bireylere ait normal doku örneğinden SV40 Total RNA İzolasyon Kiti (Promega, ABD) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların kalite ve miktarları nanodrop'ta ölçülerek ölçüm sonrası Tablo 3-11'de verilen semi-kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılarak gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

Tablo 3-11: Semi-kantitatif RT-PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek için hacim
10X PCR Buffer	5 µL
250 µM dNTP karışımı	1 µL
3 mM MgCl ₂	6 µL
0,3 µM Forward Primer	0,5 µL
0,3 µM Reverse Primer	0,5 µL
2U Taq DNA Polimeraz	0,4 µL
c DNA	2,5 µL
dH ₂ O	31,6 µL
DMSO (%5)	2,5 µL
Toplam Hacim	50 µL

PCR karışımı toplam hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlanarak Tablo 3-12’de verilen koşullar kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3-12: Semi-kantitatif RT-PCR deney koşulları

Reaksiyon Koşulları	Denatürasyon		95°C 10 dk
	Denatürasyon	38 siklus	95°C 1 dk
	Bağlanma		60°C 1 dk
	Uzama		72°C 1 dk
	Soguma		72°C 10 dk

PCR ürünleri 13 µl kesim ürünü ve 0,5 µl 10x Orange G yükleme tamponu karışımı olacak şekilde %2,5’luk agaroz jele yüklendi.

3.2.8. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Tekniği ile Polimorfik Bölgelerin İncelenmesi

Larenks kanseri tanısı almış 50 hastaya ve 20 sağlıklı bireye ait lenfositten elde edilen DNA örneklerinde *TNFA* genindeki polimorfik bölgelere (c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A, c.-1031T>C) özgü primerler ve bu bölgelere uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak polimorfik değişiklikler RFLP yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR)

TNFA geninin promoter bölgesinde bulunan c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A, c.-1031T>C polimorfik değişikliklerin incelenmesi amacıyla lenfositten elde edilen DNA Tablo 3-7’de verilen polimorfik bölgelere spesifik primerler yardımıyla sırasıyla Tablo 3-13 ve Tablo 3-14’te verilen reaksiyon karışımı ve PCR koşulları kullanılarak çoğaltıldı.

Tablo 3-13: Polimorfizm deneylerinde kullanılan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek için hacim
10X PCR Buffer	5 µL
250 µM dNTP karışımı	1 µL
3 mM MgCl ₂	3 µL
0,3 µM Forward Primer	0,5 µL
0,3 µM Reverse Primer	0,5 µL
2U Taq DNA Polimeraz	0,4 µL
c DNA	2,5 µL
dH ₂ O	34,6 µL
DMSO (%5)	2,5 µL
Toplam Hacim	50 µL

Tablo 3-14: Polimorfizm deneylerinde kullanılan PCR koşulları

Reaksiyon Koşulları	Denatürasyon		95°C 10 dk
	Denatürasyon		95°C 30 sn
	Bağlanma	38 siklus	55°C 30 sn
	Uzama		72°C 30 sn
	Soğuma		72°C 10 dk

3.2.8.2. Restriksiyon Enzim Kesim İşlemleri

PCR sonrası çoğaltılan örnekler Tablo 3-15'te verilen reaksiyon karışımı ve Tablo 3-1'de verilen polimorfik bölgelere özgü restriksiyon enzimleri ile kesime uğratıldı.

Tablo 3-15: Restriksiyon enzimlerine kesim işleminde kullanılan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek için hacim
1X Restriksiyon Enzim Buffer	2 µL
10U Restriksiyon Enzimi	1 µL
PCR ürünü	10-15 µL
dH ₂ O	2-7 µL
Toplam Hacim	20 µL

Enzim kesim ürünleri 14 µl kesim ürünü ve 4 µl SSCP yükleme tampon karışımı olacak şekilde %15'lik PAGE'e yüklendi.

3.2.9. Veri Analizi

Allel ve genotip frekansları De-Finetti vaka-kontrol istatistik programı ile allelerin birbirleriyle olan ilişkileri SNPalyze programı yardımıyla değerlendirildi. Hastalara ait klinik parametrelerle promoter metilasyonu ve ekspresyon durumları arasındaki ilişkilerin anlamlılığı SPSS paket istatistik programları ile χ^2 testleri (Yates, Fisher's exact) kullanılarak değerlendirildi. Bu parametrelerin hastalık riskiyle ilişkisi ise internette kullanıma açık olarak bulunan Odds ratio ve güven aralığı hesaplayan istatistik programı ile hesaplandı.



4. BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran larenks kanseri tanısı almış 50 hasta ile kendisi ve ailesinde benin veya malin hikayesi bulunmayan 20 sağlıklı bireyin demografik verileri sırasıyla Tablo 4-1 ve Tablo 4-2'de, larenks kanserli hastalara ait klinik bilgiler Tablo 4-3'te verilmiştir.

Tablo 4-1: Larenks kanserli hastalara ait parametrelerin sayısal dağılımı

<u>Klinikopatolojik bilgiler</u>		<u>Hasta sayısı (%)</u>	
Cinsiyet	Kadın	1	(%2)
	Erkek	49	(%98)
Yaş	<45	1	(%2)
	≥45	49	(%98)
Anatomik Tutulum Bölgesi	Supraglottik	15	(%30)
	Glottik	11	(%22)
	Subglottik	0	(%0)
	Transglottik	24	(%48)
Histopatolojisi	Yassı epitel hücreli (YEH)	50	(%100)
Evre	I	0	(%0)
	II	10	(%20)
	III	17	(%34)
	IV	23	(%46)
Differansiyasyon derecesi	İyi	16	(%32)
	Orta	28	(%56)
	Az	6	(%12)
Lenf nodu tutulumu	(-)	38	(%76)
	(+)	12	(%24)
Sigara	Hiç kullanmamış	5	(%10)
	Kullanıyor	44	(%88)
	Bırakmış	1	(%2)
Alkol kullanımı	(-)	29	(%58)
	(+)	16	(%32)
	Belirtilmemiş	5	(%10)
Nüks	(-)	45	(%90)
	(+)	5	(%10)
Metastaz	(-)	46	(%92)
	(+)	4	(%8)

Klinikopatolojik verilere göre hastaların %98'i erkek ve 45 yaş üstü bireylerden oluşmaktadır. Hastaların anatomik tutulum bölgesi olarak daha çok transglottik bölgede yayılım gösterdiği ve histopatolojik olarak tamamının yassı epitel hücreli, ileri evre olduğu görülmektedir. Sigara ve alkol kullanım oranı sırasıyla %88 ve %32 olarak bulundu. Hastaların %24'ünde lenf nodu tutulumu görülürken %10'unda nüks ve %8'inde metastazla geri dönüş olduğu bildirilmiştir.

Tablo 4-2: Sağlıklı bireylere ait demografik verilerin dağılımı

		Sağlıklı birey sayısı (%)	
Cinsiyet	Kadın	3	(%15)
	Erkek	17	(%85)
Yaş	<45	7	(%35)
	≥45	13	(%65)
Sigara	Kullanmıyor	10	(%50)
	Kullanıyor	10	(%50)
Alkol kullanımı	Kullanmıyor	16	(%80)
	Kullanıyor	4	(%20)

Sağlıklı bireylerin %85'i erkek olup, %45'i 45 yaşın üzerindedir. %45'i sigara, %15'i alkol kullanmaktadır.

Tablo 4-3:Larenks kanserli hastalara ait klinik bilgiler

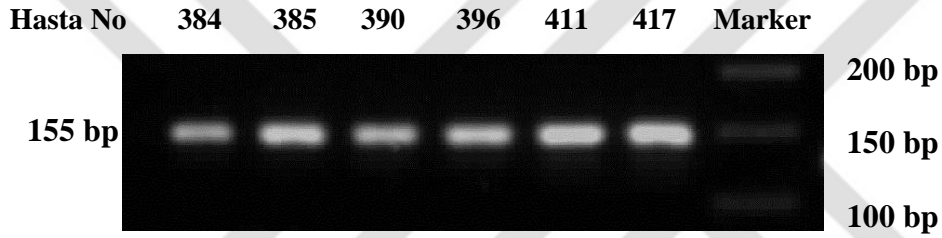
HASTA NO	YAŞ	CİNS.	Supraglottik / Glottik/ Transglottik	EVRE				LNT	SİGARA	MET.	ALKOL	DIF. DER.	NÜKS TAKİBİ
				overall	t	n	m						
SL 384	63	E	Transglottik	4	4a	0	x	(-)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 385	55	E	Supraglottik	4	2	2b	x	(+)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 390	61	E	Glottik	2	2	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 396	51	E	Transglottik	2	2	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 411	48	E	Transglottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 417	65	E	Glottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 428	53	E	Transglottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 435	55	E	Transglottik	4	4	1	x	(+)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 437	64	E	Transglottik	4	4	0	X	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(+)
SL 442	64	E	Glottik	2	2	0	X	(-)	(+)	(-)	(+)	iyi	(-)
SL 452	63	E	Transglottik	4	4	0	x	(-)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 454	58	E	Transglottik	3	3	0	X	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 455	54	E	Supraglottik	4a	3	2a	x	(+)	(+)	(-)	(-)	Orta	(+)
SL 456	46	E	Glottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(+)	İyi	(-)
SL 460	52	E	Supraglottik	2	2	0	x	(-)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 461	65	E	Transglottik	4a	4a	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	İyi	(-)
SL 493	53	E	Glottik	4	4	x	x	(-)	(+)	(+)	(-)	iyi	(+)
SL 495	67	E	Supraglottik	4	2	2b	x	(-)	(+)	(-)	(-)	Az	(-)
SL 497	62	E	Glottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 501	50	E	Supraglottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 507	58	E	Glottik	3	3	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 508	62	E	Glottik	2	2	0	x	(-)	(-)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 510	71	E	Transglottik	3	3	0	mx	(-)	(+)	(+)	(-)	Orta	(-)
SL 511	68	E	Supraglottik	3	3	0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 513	52	E	Transglottik	4	4	2c	mx	(+)	(+)	(-)	(+)	Orta	(+)
SL 515	59	E	Transglottik	4	4	0	x	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 522	68	E	Transglottik	4	4	0	0	(-)	(-)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 524	74	E	Transglottik	4	3	2c	x	(+)	(+)	(-)	(-)	Az	(+)
SL 527	58	E	Supraglottik	3	3	n1	x	(+)	(-)	(-)	(-)	Az	(-)
SL 570	54	E	Transglottik	3	t3	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(+)	İyi	(-)
SL 573	50	E	Transglottik	2	t2	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(+)	İyi	(-)
SL 574	66	K	Supraglottik	4a	3	2c	x	(+)	(-)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 622	59	E	Supraglottik	4a	t4a	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	İyi	(-)
SL 632	63	E	Glottik	4a	t4a	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(+)	İyi	(-)
SL 658	72	E	Supraglottik	3	3	x	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 680	55	E	Glottik	4	4	0	mx	(-)	(-)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL688	65	E	Transglottik	3	3	0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL709	60	E	Supraglottik	4	4	2a	mx	(+)	(+)	(-)	(-)	Az	(-)
SL721	73	E	Transglottik	4	4	2C	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL731	64	E	Supraglottik	3	3	0	mx	(+)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 744	63	E	Transglottik	4	4a	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(+)	İyi	(-)
SL 745	66	E	Transglottik	4A	4a	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Az	(-)
SL 748	57	E	Glottik	3	3	0	mx	(-)	(+)	(-)	(+)	Orta	(-)
SL 749	44	E	Supraglottik	2	2	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 754	51	E	Supraglottik	2	2	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(+)	Az	(-)
SL 762	46	E	Supraglottik	2	2	0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)
SL 764	54	E	Transglottik	2	2	n0	mx	(-)	(+)	(-)	(-)	iyi	(-)
SL 766	45	E	Transglottik	3	3	n1	mx	(+)	(+)	(-)	(-)	Orta	(-)

*K:Kadın, E:Erkek, LNT: Lenf Nodu Tutulumu, Met: Metastaz, Dif. Der: Differansiyasyon Derecesi)

4.1. *TNFA* Geninin Promoter Bölgesindeki Polimorfizmlerin İncelenmesi

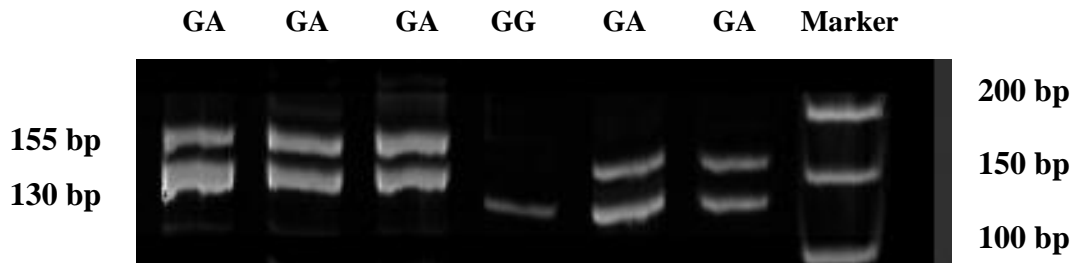
Larenks kanseri tanısı almış 50 hastaya ve 20 sağlıklı bireye ait periferik kandan elde edilen DNA örneklerinde *TNFA* genindeki polimorfik bölgelere (c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A, c.-1031T>C) özgü primerler ve bu bölgelere uygun restriksiyon enzimleri kullanılarak gene ait polimorfik değişiklikler RFLP yöntemiyle incelendi. Örneklere ait genotip frekansları hastalığa yatkınlık açısından değerlendirilerek genotip dağılımları klinik bulgularla karşılaştırıldı.

TNFA geninin promoter bölgesinde bulunan c.-238G>A tek nükleotid değişikliği incelenmiştir. -238. nükleotidin bulunduğu bölge uygun primerler yardımıyla çoğaltılarak 155 baz çifti (bp) uzunluğunda ürün elde edildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: c.-238G>A polimorfizm bölgesini içeren 155 bp'lik PCR ürünü

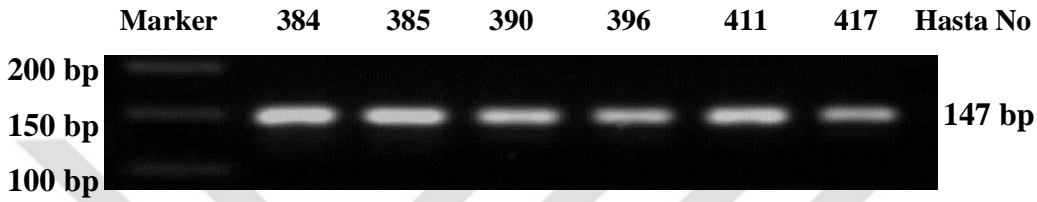
PCR ürünü BamHI restriksiyon enzimi yardımıyla kesildi. Restriksiyon enzimi sadece guanin nükleotidinin bulunduğu bölgeyi keserek 130 ve 25 bp'lik enzim kesim ürününe neden olurken G>A değişimi sonucu enzim tanıma bölgesi ortadan kalkar. Kesim olmayacağından homozigot varyant genotip için 155 bp uzunluğunda tek bant heterozigot örnekler için 155, 130 ve 25 bp uzunluğunda üç fragment gözlenir (Şekil 4-2)



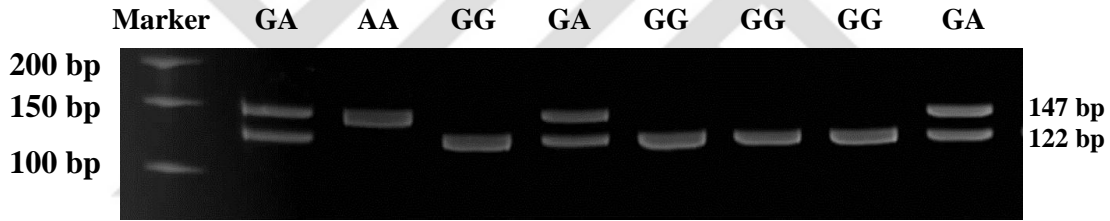
Şekil 4-2:c.-238G>A polimorfizmi BamHI enzim kesim ürünleri

TNFA geninin promotor bölgesindeki 308. nükleotidinde yer alan guanin nükleotidinin adenine değişimi bölgeye uygun primerler yardımı ile PCR sonrası gerçekleştirilen enzim kesimiyle incelendi.

Elde edilen 147 bp'lik PCR ürünü (Şekil 4-3) *NcoI* restriksiyon enzim kesimi homozigot varyantta tek bir fragment (147 bp) gözlenirken; yabani (wild) tip genotip için 122 ve 25 bp'lik ürün ve heterozigot varyant için 147, 122 ve 25'lik üç fragment saptandı. (Şekil 4-4)

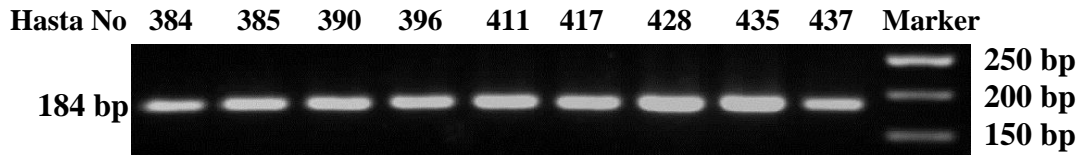


Şekil 4-3: c.-308G>A polimorfik bölgesini içeren 147 bp'lik PCR ürünü

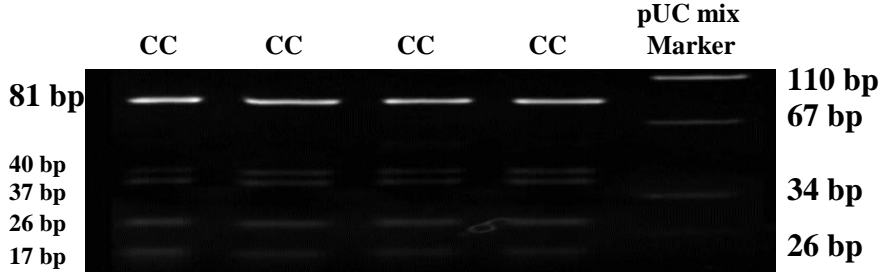


Şekil 4-4:c.-308G>A polimorfizmi *NcoI* enzim kesim ürünleri

Promoter bölgede meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerinden biri de c.-806C>T nükleotitte görülür. Değişikliğin gözlemlendiği bölge, uygun primerlerle çoğaltılarak (Şekil 4-5) *MnII* enzimiyle kesime uğrattıldı. Yabani tip genotipe sahip bireylerde 81, 40, 37, 26, 17 ve 9 bp'lik altı fragment oluşurken homozigot varyantlarda 81, 40, 37 ve 26 bp'lik dört ürünün gözlemlenmesi gerekmektedir (Şekil 4-6).

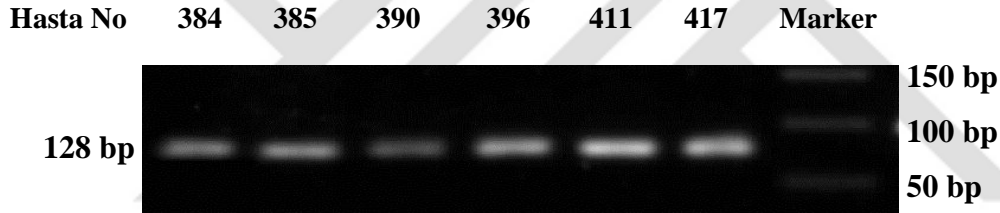


Şekil 4-5: c.-806C>T polimorfik bölgesini içeren 184 bp'lik PCR ürünü



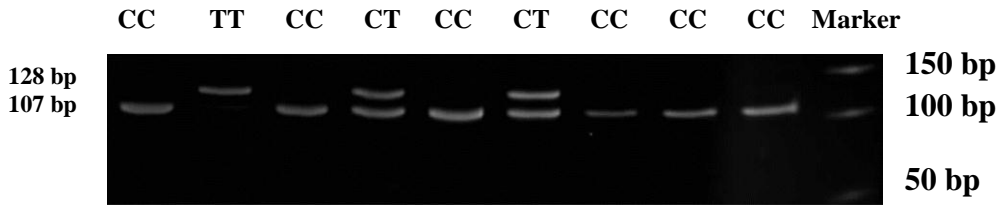
Şekil 4-6: c.-806C>T polimorfizmi MnlI enzim kesim ürünleri

TNFA geninde promoter bölgede oluşan bir diğer polimorfik değişiklik -857'de meydana gelir. c.-857C>T değişimi bu bölgenin uygun primerler kullanılarak PCR'ı sonrası oluşan ürünler Şekil 4-7'da verilmiştir. PCR ürünleri Tail enzimi yardımıyla -857. bazda yalnızca guanin nükleotidinin olduğu genotipi tanıyarak 107 ve 21 bp'lik iki fragment oluşturdu.



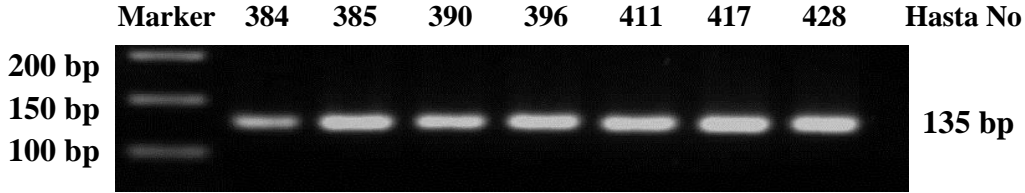
Şekil 4-7: c.-857C>T polimorfik bölgesini içeren 128 bp'lik PCR ürünü

Timin nükleotid değişikliği gözlenen fragmentte enzim tanıma bölgesi değiştiğinden ve restriksiyon enzimi bu bölgeyi tanıyıp kesemeyeceğinden 128 bp uzunluğunda tek bir fragment oluşumu gözlemlendi. Heterozigot varyant oluşumu 128, 107 ve 21 bp'lik üç fragment oluşumuyla tespit edildi (Şekil 4-8)



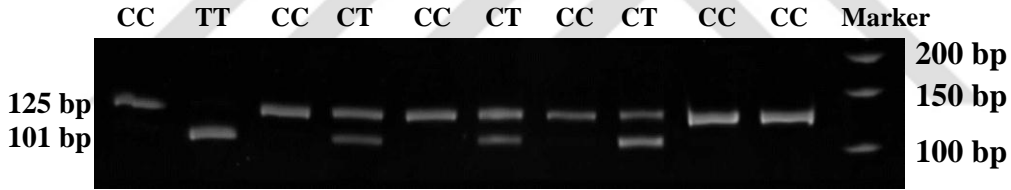
Şekil 4-8: c.-857C>T polimorfizmi TailI enzim kesim ürünleri

-863. nükleotitte konumlanmış olan sitozin bazında meydana gelen polimorfizmin tespiti için öncelikle bölgeye spesifik primerlerle PCR gerçekleştirildi (Şekil 4-9). PCR ürünleri yine Tail enzimiyle kesime uğratarak C>A değişimi incelendi.



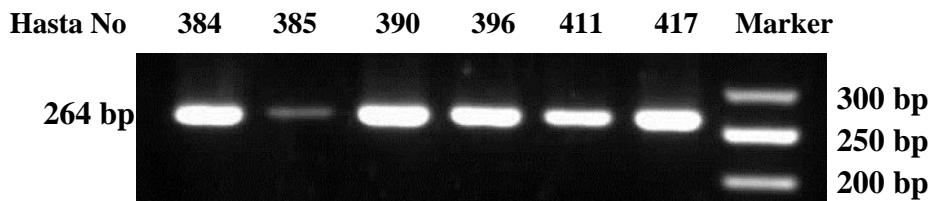
Şekil 4-9: c.-863C>A polimorfik bölgesini içeren 147 bp'lik PCR ürünü

Yabanıl tipte 125 bp uzunluğunda tek fragment, heterozigot varyantta 125, 101 ve 34 bp'lik üç fragment oluşurken homozigot varyantta 101 ve 34 bp'lik iki adet fragment gözlemlendi (Şekil 4-10)

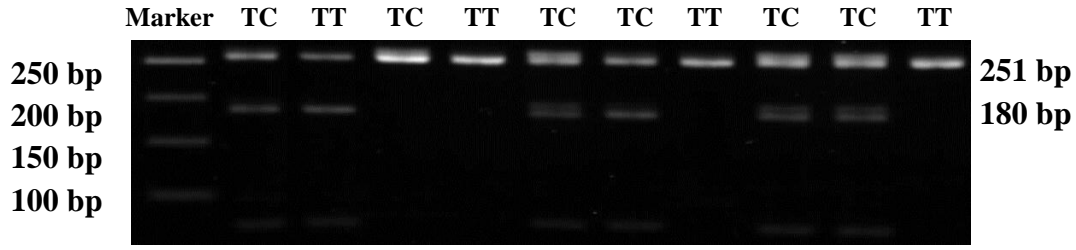


Şekil 4-10: c.-863C>A polimorfizmi Tail enzim kesim ürünleri

-1031. nükleotitte meydana gelen T>C baz değişikliği bölgeye spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Yabanıl tipte 251 ve 13 bp'lik, heterozigot varyantta 251, 180, 71 ve 13 bp'lik ve homozigot varyantta ise 180, 71 ve 13 bp'lik fragment gözlemlendi. PCR sonrası elde edilen DNA fragmentleri ile kesim sonrası oluşan ürünler sırasıyla Şekil 4-11 ve Şekil 4-12'de verilmiştir.



Şekil 4-11: c.-1031T>C polimorfik bölgesini içeren 264 bp'lik PCR ürünü



Şekil 4-12: c.-1031T>C polimorfizmi BbsI enzim kesim ürünleri

TNFA geninin promoter bölgesinde meydana gelen polimorfizmlere ait genotip ve allel frekansları Tablo 4-4'te gösterilmiştir.

Allel ve genotip frekansları ile allelerin birbirleriyle olan ilişkileri De-Finetti vaka-kontrol istatistik programı ile değerlendirilmiştir. *TNFA* geninin promoter bölgesinde bulunan c.-238G>A, c.-806C>T, c.-857C>T ve c.-863C>A polimorfizmlerinin hastalar ve sağlıklı grup arasında hastalık riski açısından anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Hasta ve kontrol grubu, c.-308G>A polimorfizmi açısından karşılaştırıldığında GG genotipi hastalarda belirgin oranda sıklıkla görülürken A allelini taşıyan bireylerde riskin anlamlı ölçüde düşük olduğu dikkat çekmektedir (GG vs GA+AA: OR (%95 CI) = 0,19 (0,06-0,59), p=0,002, $\chi^2=9,01$). Normal allelin frekans dağılımı hastalarda 0,89, sağlıklılarda 0,87'dir. Çalışma grubumuzda A allelinin frekans dağılımı hastalarda 0,11, sağlıklılarda ise 0,13'tür. A alleli ile düşük hastalık riski arasında istatistiksel anlamlılık görülmektedir (G vs A: OR (%95 CI) = 0,35 (0,14-0,85), p=0,018, $\chi^2=5,63$).

c.-1031T>C polimorfizmi için C allelinin hasta ve kontrol grupları kıyaslandığında frekansı hasta grubunda 0,41, kontrol grubunda 0,57 olarak bulunmuştur. Genotip frekanslarına bakıldığında TC genotip frekansının hastalarda sağlıklılarla oranla anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir (TT vs TC: OR (%95 CI) = 7,00 (1,75-27,93), p=0,003, $\chi^2=8,76$).

Tablo 4-4 : TNFA gen polimorfizmlerinin larenks kanserli hasta ve sağlıklı gruptaki genotip ve allel frekanslarının hastalık riski açısından analizi

Polimorfizm	Genotip	Hasta (n=50) n (%)	Kontrol (n=20) n (%)	OR (%95 CI)	P (χ^2)
c.-238G>A	GG	27 (54)	15 (45)	1 (referans)	-----
	GA	23 (46)	5 (25)	2,56 (0,81-8,11)	0,11 (2,62)
	AA	0 (0)	0 (0)	0,56 (0,01-29,84)	-----
	GA+AA	23 (46)	5 (25)	2,56 (0,81-8,11)	0,11 (2,62)
	Alleller				
	A	23 (23)	5 (12,5)	2,09 (0,73-5,95)	0,16 (1,97)
	G	77 (77)	35 (87,5)	1 (referans)	-----
c.-308G>A	GG	40 (80)	15 (45)	1 (referans)	-----
	GA	9 (18)	5 (25)	0,19 (0,06-0,59)	0,002 (9,01)
	AA	1 (2)	0 (0)	0,662 (0,02-17,70)	0,65 (0,21)
	GA+AA	10 (20)	5 (25)	0,21 (0,07-0,64)	0,004 (8,22)
	Alleller				
	A	11 (11)	5 (12,5)	0,35 (0,14-0,85)	0,018 (5,63)
	G	89 (89)	35 (87,5)	1 (referans)	-----
c.-857C>T	CC	36 (72)	16 (80)	1 (referans)	-----
	CT	13 (26)	4 (20)	1,44 (0,41-5,12)	0,57 (0,33)
	TT	1 (2)	0 (0)	1,36 (0,05-35,08)	0,51 (0,44)
	CT+TT	14 (28)	4 (20)	1,56 (0,44-5,47)	0,49 (0,48)
	Alleller				
	T	15 (15)	4 (10)	1,58 (0,49-5,11)	0,43 (0,61)
	C	85 (85)	36 (90)	1 (referans)	-----
c.-863C>A	CC	33 (66)	10 (50)	1 (referans)	-----
	CA	15 (30)	9 (45)	0,50 (0,17-1,49)	0,21 (1,54)
	AA	2 (4)	1 (5)	0,61 (0,05-7,4)	0,69 (0,16)
	CA+AA	17 (34)	10 (50)	0,51 (0,18-1,48)	0,21 (1,54)
	Alleller				
	A	19 (19)	11 (27,5)	0,62 (0,26-1,45)	0,27 (1,23)
	C	81 (81)	29 (72,5)	1 (referans)	-----
c.-1031T>C	TT	21 (42)	3 (15)	1 (referans)	-----
	TC	17 (34)	17 (85)	7,00 (1,75-27,93)	0,003 (8,76)
	CC	12 (24)	0 (0)	0,25 (0,012-5,16)	0,20 (1,64)
	TC+CC	29 (58)	17 (85)	4,10 (1,06-15,82)	0,03 (4,62)
	Alleller				
	C	41 (41)	23 (57,5)	1,06 (0,51-2,24)	0,87 (0,03)
	T	59 (59)	17 (42,5)	1 (referans)	-----

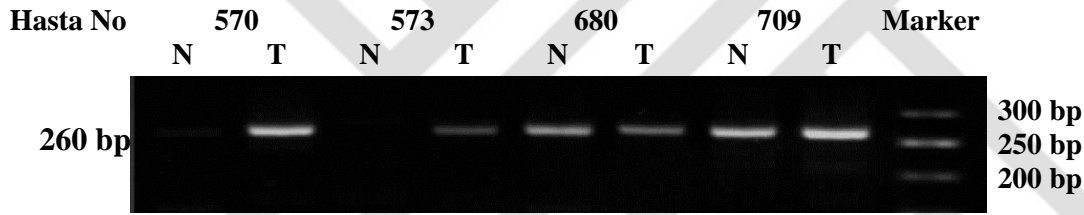
TNFA gen polimorfizmleri ile klinikopatolojik veriler karşılaştırılmıştır. Alkol kullanımı ile c.-1031T>C polimorfizmi arasındaki ilişki araştırıldığında mutant genotiplerin hastalık açısından avantaj sağladığı görülmektedir ($p=0,024$) (Tablo 4-5)

Tablo 4-5: c.-1031T>C genotip dağılımının alkol kullanımı ile ilişkisi

Alkol kullanımı	TT	TC+CC	Fisher's p
Kullanmıyor	2	12	0,024
Kullanıyor	19	17	

4.2. *TNFA* Geninin Semi-Kantitatif RT-PCR Sonuçları

50 hasta ve 20 sağlıklı bireyden alınan doku örneklerinden elde edilen cDNA'ın semi-kantitatif RT-PCR deneyleri gerçekleştirildi. *TNFA* geninin ekspresyon durumunun tespit edilmesi amacıyla 3 ve 4.ekzon bölgelerinden 260 bp'lik bölge çoğaltıldı (Şekil 4-13).

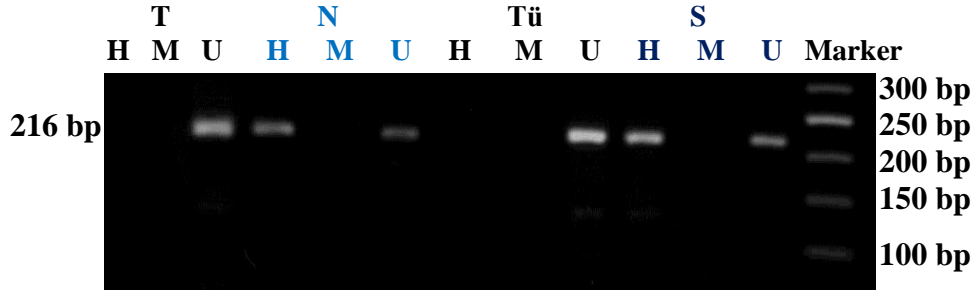
**Şekil 4-13: *TNFA* geni semi-kantitatif RT-PCR ürünleri**

TNFA geninde tümör dokuları ile normal doku karşılaştırıldığında hastaların %56'sında *TNFA* gen ekspresyonu gözlenmemiştir.

4.3. Restriksiyon Enzim Kesim Tekniği ile Metilasyon Profiline Belirlenmesi

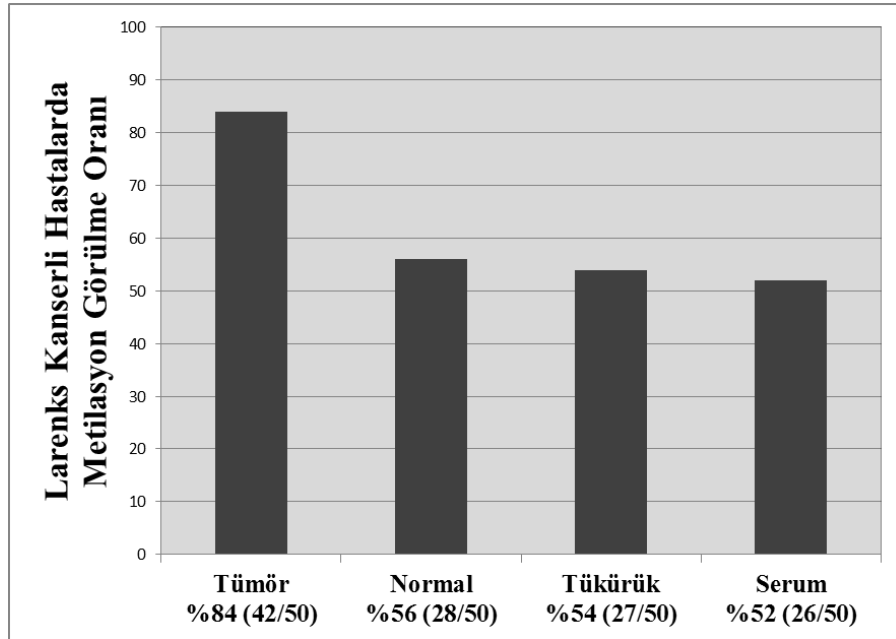
50 larenks kanserli hastanın tümör ve eşlenik normal dokusu ile serum, tükürük örnekleri ve 20 sağlıklı bireyin normal dokusu ile serum, tükürük örneklerinden elde edilen DNA, aynı kesim bölgesini tanıyan metilasyona duyarlı HpaII ve metilasyona dirençli MspI restriksiyon enzimleri yardımıyla 37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. Enzimlerden HpaII metillenmiş bölgeyi kesmezken MspI aynı bölgeyi kesme özelliğine sahiptir. HpaII enzimi metillenmiş bölgeyi kesemediğinden 216 baz çiftlik PCR ürünü oluşturur. Enzim kesimi sonrası örnekler uygun primerler yardımıyla çoğaltıldı. Şekil 4-14'te 497 nolu hastaya ait tümör (T), eşlenik normal (N), serum (S) ve tükürük (Tü) örneklerinin enzim kesimi sonrası PCR ile çoğaltılan örnekleri

gösterilmektedir. Kesim aşmasına dahil edilmeyen genomik DNA (U) örneklerinden elde edilen PCR ürünleri çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

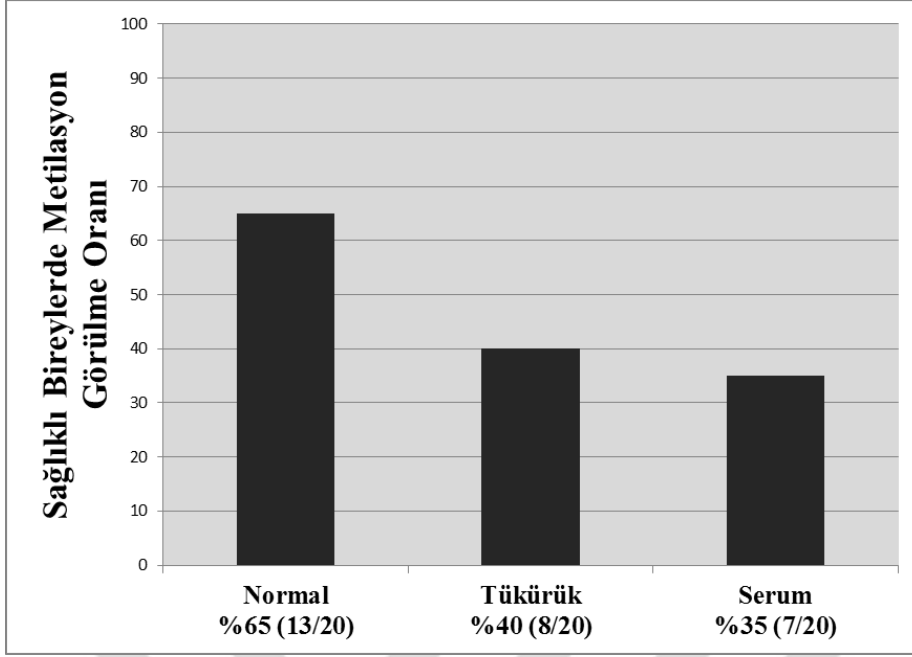


Şekil 4-14:TNFA geninin promoter bölgesinin restriksiyon enzim kesimi sonrası oluşan metilasyon durumu ve PCR örnekleri

TNFA promoter metilasyonu hastaların tümör, eşlenik normal dokusu ile serum ve tükürük örneklerinde görülme oranı sırasıyla %84(42/50), %56(28/50), %52(26/50) ve %54(27/50)'tür (Şekil 4-15). Sağlıklı bireylerin normal doku, serum ve tükürük örneklerinde bu oran sırasıyla %65(13/20), %35(7/20) ve %40(8/20) olarak bulunmuştur (Şekil 4-16).



Şekil 4-15: Larenks kanserli hastaların tümör, eşlenik normal doku ile serum ve tükürük örneklerinde metilasyon görülme oranı



Şekil 4-16: Sağlıklı bireylere ait normal doku ile serum ve tükürük örneklerinde metilasyon görülme oranı

Metilasyon durumu ile hastaların klinikopatolojik verileri karşılaştırıldığında sigara, alkol kullanımı, nüks ve metastaz durumu, lenf nodu tutulumu, anatomik tutulum bölgesi ile metilasyon durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak evrelere göre metilasyon durumu incelendiğinde geç evrede (evre III- evre IV) *TNFA* geninde metilasyon görülme açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu metilasyon varlığının hastalık riskiyle ilişkili olabileceği bulunmuştur ($p=0,023$).

4.4. Metilasyona bağlı ekspresyon durumundaki değişiklikler

Metilasyona spesifik restriksiyon enzim kesimi ve semi-kantitatif RT-PCR sonucu *TNFA* geninde malin tümör dokusunda metilasyon gözlenen 42 hasta ve ekspresyon gözlenmeyen 28 hasta karşılaştırıldığında hastaların 21(%42)'inde metilasyona bağlı ekspresyon durumunda azalma gözlenmiştir.

4.5. Polimorfik genotiplerle metilasyon durumu arasındaki ilişkinin incelenmesi

Çalışmamızda larenks hastalarında incelenen polimorfik farklılıklar ve metilasyon durumları arasındaki olası ilişkiler araştırılmıştır. Bu değişiklikler kendi aralarında kıyaslanmıştır. c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A

ve c.-1031T>C polimorfik değişiklikler ile metilasyon durumu arasındaki ilişki incelendiğinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

4.6. Polimorfik farklılıkların birlikte bulunma durumları

c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A ve c.-1031T>C polimorfik farklılıkları kontrol ve hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldı (Tablo 4-6). Hasta-kontrol gruplarının haplotip analizi için SNPalyze programı kullanıldı.

Hasta ve kontrol grupları arasında polimorfik değişikliklerin haplotip frekansları karşılaştırıldığında, c.-238G>A/c.-308G>A, c.-238G>A/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-863C>A, c.-308G>A/ c.-1031T>C, c.-857C>T/c.-863C>A, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-857C>T, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-863C>A, c.-238G>A/c.-308G>A/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-857C>T/c.-1031T>C, c.-308G>A/c.-863C>A/c.-1031T>C haplotipleri için anlamlı derecede birbirleriyle ilişkili oldukları gözlemlendi.

Tablo 4-6: Hasta ve kontrol gruplarında haplotip frekanslarının analizi

Haplotip Kombinasyonları	Haplotip Frekansları		p	χ^2
	Hasta	Kontrol		
c.-238G>A/c.-308G>A			0,003	13,401
G-A	0,059	0,260	0,004	12,243
c.-238G>A/c.-1031T>C			0,041	8,280
A-T	0,149	2,36x10 ⁻⁷	0,012	6,290
c.-308G>A/c.-863C>A			0,008	11,644
A-A	1,39x10 ⁻⁷	0,100	0,001	10,294
c.-308G>A/ c.-1031T>C			0,004	13,274
G-T	0,490	0,270	0,018	5,617
A-T	0,099	0,30	0,001	9,711
c.-857C>T/c.-863C>A			0,034	8,663
T-A	7,52x10 ⁻⁸	0,060	0,022	5,203
c.-238G>A/c.-308G>A/c.-857C>T			0,008	19,034
G-A-C	0,058	0,160	0,044	4,073
G-G-T	0,091	2,29x10 ⁻⁹	0,049	3,888
G-A-T	1,47x10 ⁻¹⁹	0,070	0,005	7,664
c.-238G>A/c.-308G>A/c.-863C>A			0,004	20,486
G-A-C	0,057	0,183	0,015	5,862
G-A-A	1,15x10 ⁻⁶	0,056	0,022	5,203
A-A-A	4,94x10 ⁻²¹	0,060	0,022	5,203
c.-238G>A/c.-308G>A/c.-1031T>C			0,0001	28,806
G-A-T	0,035	0,300	0,000003	21,525
c.-238G>A/ c.-857C>T/c.-1031T>C			0,109	11,735
A-C-C	0,039	0,125	0,030	4,710
c.-238G>A/c.-863C>A/c.-1031T>C			0,239	7,989
A-C-T	0,132	2,56x10 ⁻⁷	0,016	5,794
c.-308G>A/c.-857C>T/c.-1031T>C			0,018	16,90
A-C-T	0,089	0,233	0,015	5,825
c.-308G>A/c.-863C>A/c.-1031T>C			0,031	13,839
G-C-T	0,470	0,275	0,030	4,674
A-C-T	0,092	0,262	0,011	6,454

4.7. Polimorfik Değişiklikler ile Metilasyona Bağlı Ekspresyon Durumu Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Polimorfik değişiklikler ile tümör dokusunda metilasyon ve buna bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastalar ile bu hastalarda görülen polimorfik değişiklikler arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır.



5. TARTIŞMA

Larenks kanseri baş-boyun kanserleri arasında en sık görülen 2. kanser tipidir. Erken aşamada tanı konulduğunda tedavi şansı olsa da geçtiğimiz 30 yıl içerisinde erken tanı, prognoz, nüks riski olan hastaları ayırt etmeye yönelik güvenilir biyobelirteçler bulunmamaktadır (42). Kanser oluşmadan önce genetik yatkınlığın belirlenmesi koruyucu tedavi açısından, kanser oluşumunda moleküler basamakların bilinmesi ve oluşan genetik ve/veya epigenetik değişikliklere yönelik tedavi önerilmesi hastalığın prognozu açısından önem arz etmektedir.

Larenks kanserinin oluşumunda sigara, alkol, mesleki kimyasallara maruziyet en önemli etiyolojik faktörlerdir (53, 54). Bu etiyolojik faktörlerin genetik ve epigenetik değişikliklere neden olarak hücrel immunitiyi de baskıladığı bilinmektedir. Sitokinler doğrudan veya dolaylı malinite oluşumunda rol oynayan önemli inflamatuvar araçlardır.

Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (*TNFA*) inflamatuvar hastalıklarda görev yapan proinflamatuvar sitokindir. Tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkileri aktifleyerek immün yanıtı düzenler ve anjiyogenez ve apoptotik yolların aktivasyonunda önemli rolü bulunmaktadır. Literatürde *TNFA* geninin promoter bölgesinde meydana gelen polimorfik değişiklikler meme (17), mide (18), prostat (19) ve kolorektal (20) kanser ile non-Hodgkin lenfomada (21) incelenmiş ve *TNFA* ekspresyon seviyesindeki artışın kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda popülasyona göre genetik yatkınlıklar belirtilmiştir. *TNFA* geninin promoter bölgesinde bulunan c.-238G>A, c.-308G>A'in tek nükleotidlik değişikliklerin Asya toplumunda hepatosellüler (160), kolorektal karsinom (165) oluşumunda etkili olabileceği, farklı popülasyon olan Kafkas ve Afrika toplumunda ise serviks kanserinin gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (162). c.-863C>A polimorfizmi özellikle Asya toplumunda gastrik (161), prostat (163), mesane (164) kanserlerine yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir.

Kanserde hem genetik hem de epigenetik değişikliklerin rol oynadığı bilinmektedir. Birçok kanser türünde TSG'lerin promoter bölgelerindeki CpG adalarının metillenmesi sonucu bu genlerin görevini yerine getiremediği bilinmektedir. *TNFA* geninin promoter bölgesinde metilasyon ve buna bağlı ekspresyon seviyesinde azalma kolorektal (22), prostat (23) ve meme kanserlerinde (24) gözlenmiştir. 2012'de Kim ve arkadaşları tarafından MCF7 hücre hatlarında global metilasyon seviyesi incelenmiş ve

TNFA geninin ve *TNFA* ilişkili yollarda görev alan genlerin hipermetile olduğu ve bunun meme kanserinin oluşumunda katkısının olabileceği düşünülmüştür (159).

Çalışmamızda 50 larenks kanserli hastanın tümör, eşlenik normal doku, tükürük, ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylere ait normal doku, tükürük ve serum örnekleri kullanılarak *TNFA* geninde metilasyona bağlı ekspresyon durumu incelenmiş *TNFA* geninin promoter bölgesinde meydana gelen c.-238G>A, c.-308G>A, c.-806C>T, c.-857C>T, c.-863C>A ve c.-1031T>C polimorfik değişiklikleri incelenmiştir.

TNFA geninin promoter bölgesinde metilasyon durumu incelendiğinde hastaların tümör dokularında %84 oranında metilasyon varlığı gözlemlendi. Ekspresyon seviyelerine bakıldığında ise hastaların %56'sında *TNFA* gen ekspresyonunda azalma görüldü. Hastaların %42'sinde tümör dokusunda metilasyon ve buna bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Metilasyon durumu ile hastaların klinikopatolojik verileri karşılaştırıldığında sigara, alkol kullanımı, nüks ve metastaz durumu, lenf nodu tutulumu, anatomik tutulum bölgesi ile metilasyon durumu arasında anlamlı bir ilişki bulunamazken ($p>0,05$) evrelere göre istatistiksel anlamlılık bulunmuştur. İleri evre hastalarda (evre III-IV), erken evre hastalara (evre I-II) göre metilasyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda *TNFA* geninin promoter bölgesinde bulunan c.-238G>A, c.-857C>T ve c.-863C>A polimorfizmlerini hasta ve sağlıklı grup ile hastalık riski açısından değerlendirdiğimizde larenks kanseri ile arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır. Literatürde, c.-238G>A, c.-857C>T ve c.-863C>A tek nükleotid değişiklikleri birçok kanser türünde araştırılmış ve farklı popülasyonlarda farklı polimorfik değişikliklere rastlanmıştır. c.-238G>A, c.-308G>A tek nükleotid değişikliklerinin Asya toplumunda hepatosellüler (161), kolorektal karsinom (164) riskiyle ilişkili olabileceği, ayrıca bu polimorfik değişikliklerinin Kafkas ve Afrika toplumlarında serviks kanserine (166) yatkınlıkla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. c.-863C>A polimorfizmi özellikle Asya toplumunda gastrik, prostat ve mesane kanserlerine yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda *TNFA* geninin promoter bölgesinde bulunan c.-806C>T polimorfizmi hasta ve sağlıklı grup ile hastalık riski açısından değerlendirdiğimizde larenks kanseri ile arasında istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır. Literatüre baktığımızda bu polimorfizmi kanserde inceleyen bir çalışma mevcuttur. c.-806C>T

polimorfizmi, 2006 yılında Ho ve arkadaşları tarafından nazofarenks kanserinde araştırılmıştır (160). 23 hasta ve 52 kontrol grubu kullanılarak Tayvan popülasyonunda yapılan çalışmada 1 hasta ve 6 sağlıklı bireyde polimorfizme rastlanmış ve istatistiksel açıdan bir anlamlılık bulunamamıştır.

Çalışmamızda, hasta ve kontrol grupları c.-308G>A polimorfizmi açısından karşılaştırıldığında GG ve GA genotipi hastalarda belirgin oranda sıklıkla görülürken AA genotipini taşıyan bireylerde hastalık riski açısından anlamlılık görülememiştir; ancak GA genotipine sahip bireylerde hastalık riskinin anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur GG vs GA+AA: OR (%95 CI) = 0,19 (0,06-0,59), p=0,002, $\chi^2=9,01$). Normal allelin frekans dağılımı hastalarda 0,89, sağlıklılarda 0,87'dir. Çalışma grubumuzda A allelinin frekans dağılımı hastalarda 0,11, sağlıklılarda ise 0,13'tür. A alleli ile düşük hastalık riski arasında istatistiksel anlamlılık görülmektedir (G vs A: OR (%95 CI) = 0,35 (0,14-0,85), p=0,018, $\chi^2=5,63$). Literatürde meme (168), kolorektal (169) ve gastrik kanserli (170) hastalarda yapılan çalışmalarda çalışmamıza paralel olarak genotipik ve allelik farklılıklara sahip bireyler ile hastalık riski arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Meme kanserli hastalarda özellikle ileri evrede kanser riski ile *TNFA* c.-308G>A polimorfik değişikliğin GA heterozigot genotipiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (168).

c.-1031T>C polimorfizmi hasta ve kontrol gruplarında hastalık riski açısından karşılaştırıldığında TT genotipine hastalarda daha sık rastlanmakta ve TC genotipinde hastalık riski istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulunmuştur (TT vs TC: OR (%95 CI) = 7,00 (1,75-27,93), p=0,003, $\chi^2=8,76$). Literatürde c.-1031T>C polimorfizmi meme (168), kolorektal (169), mesane (164) kanserlerinde araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda TT ve CC genotiplerinin kanser oluşum riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

Polimorfik değişiklikler ile tümör dokusunda metilasyon ve buna bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastalar ile bu hastalarda görülen polimorfik değişiklikler arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır. Literatürde *TNFA* geninin metilasyona bağlı ekspresyon durumu ile polimorfik değişikliklerin birlikte incelendiği çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak larenks kanserli hastaların tümör ve eşlenik normal doku örneklerinde literatürle uyumlu olarak *TNFA* geninin promoter bölgesinde meydana gelen metilasyon ve buna bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi. *TNFA* gen

ekspresyon seviyesinde bu azalmanın kanserde ileri evrede (evre II, IV) istatistiksel anlamlı olduğunun bulunması kanser progresyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda polimorfik değişiklikler incelendiğinde c.-308G>A ve c.-1031T>C ile düşük hastalık riski arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir. Bundan sonraki aşamada çalışılan hasta ve sağlıklı örnek sayısının artırılarak metilasyon varlığı ile buna bağlı ekspresyon durumu ve polimorfik değişikliklerin daha geniş hasta popülasyonunda incelenmesi hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2017; **67**(1): 7-30.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015; **65**(2): 87-108.
3. Türkiye Kanser İstatistikleri [web page on Internet] 2017. Erişim Tarihi (09.07.2017), T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Kanser Daire Başkanlığı: http://kanser.gov.tr/Dosya/ca_istatistik/2014-RAPOR._uzun.pdf.
4. Landry D, Glastonbury CM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a review. *Radiol Clin North Am* 2015; **53**(1): 81-97.
5. Shin JY, Truong MT. Racial disparities in laryngeal cancer treatment and outcome: a population-based analysis of 24,069 patients. *Laryngoscope*. 2015;**125**:1667-1674.
6. Marur, Shanthi. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment, *Mayo Clinic Proc*, **91**(3): 386– 396.
7. Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. *Mutant Res*, 2005; **591**(1), 110-22.
8. Chan KK, Brennan K, You NY, Lu X, Song Y, Hsu Y ve ark. Common Variations in the Genes Coding for C-Reactive Protein (CRP), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), and Interleukin-6 (IL-6) and Risk of Clinical Diabetes in the Women's Health Initiative Observational Study (WHI-OS). *Clin Chem*, 2011; **57**(2), 317-25.
9. Rasmussen SK, Urhammer SA, Jensen JN, Hansen T, Borch Johnsen K, Pedersen O. The -238 and -308 G>A polymorphisms of the tumor necrosis factor alpha gene promoter are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians. *J Clin Endocr Metab*, 2000; **85**: 1731-34.
10. Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, Bjorntorp P. G-308A polymorphism of the tumor necrosis factor alpha gene promoter and salivary cortisol secretion. *J Clin Endocr Metab*, 2001; **86**: 2178-80.

11. Knight JC, Udalova I, Hill AVS, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K ve ark. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nature Genet*, 1999; **22**: 145-50.
12. Liu CJ, Wong YK, Chang KW, Chang HC, Liu HF, Lee YJ. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2005; **34**: 608-12.
13. Strieter RM, Kunkel SM, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med*, 1993; **21**(10):447-63.
14. Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol*, 1990; **145**(1), 149-54.
15. Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating Tumor Necrosis Factor- α Concentrations in a Native Canadian Population with High Rates of Type 2 Diabetes Mellitus 1. *J Clin Endocr Metab*, 1999; **84**(1), 272-78.
16. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH ve ark. Association of TNF- α promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet*, 2003; **12**(19), 2541-46.
17. Kamali-Sarvestani E, Gharezi-Fard B, Sarvari J. Association of TNF- α and TNF- β gene polymorphism with steroid receptor expression in breast cancer patients. *Pathol Oncol Res*, 2005; **11**(2), 99-102.
18. de Oliveira JG, Rossi AF, Nizato DM, Cadamuro AC, Jorge YC, Valsechi MC ve ark. Influence of functional polymorphisms in TNF- α , IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer. *Tumor Biology*, 2015, **36**(12), 9159-9170.
19. Horvat V, Sudarević B, Cosić I, Milicević N, Bosnjak S, Mandić S ve ark. Lack of association between TNF-alpha promoter polymorphism and prostate carcinoma susceptibility in eastern Croatian population. *Coll Antropol*, 2013; **37**(4):1199-202.
20. Guo XF, Wang J, Yu SJ, Song J, Ji MY, Cao Z ve ark. TNF- α -308 polymorphism and risk of digestive system cancers: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013;**19**(48):9461-71.
21. Wang SS, Vajdic CM, Linet MS, Slager SL, Voutsinas J, Nieters A ve ark. Associations of Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) risk with autoimmune

- conditions according to putative NHL loci. *Am J Epidemiol*, 2015; **181**(6):406-21.
22. Ganapathi SK, Beggs AD, Hodgson SV, Kumar D. Expression and DNA methylation of TNF, IFNG and FOXP3 in colorectal cancer and their prognostic significance. *Br J Cancer*, 2014; **111**(8):1581-9.
 23. Kim SJ, Kelly WK, Fu A, Haines K, Hoffman A, Zheng T ve ark. Genome-wide methylation analysis identifies involvement of TNF- α mediated cancer pathways in prostate cancer. *Cancer Letters*, 2011; **302**(1), 47-53.
 24. Pal R, Srivastava N, Chopra R, Gochhait S, Gupta P, Prakash N ve ark. Investigation of DNA damage respons and apoptotic gene methylation pattern in sporadic breast tumors using high throughput quantitative DNA methylation analysis technology. *Mol Cancer*, 2010; **9**,303:1-16.
 25. Kloth, JN, Gorter A, ter Haar N, Corver WE, Jordanova ES, Kenter GG ve ark. Lack of TNF α mRNA expression in cervical cancer is not associated with loss of heterozygosity at 6p21. 3, inactivating mutations or promoter methylation. *Mol Immunol*, 2008; **45**(1):152-9.
 26. Yano K. ve Miki Y.. Perspectives on postgenome medicine: Cancer. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*, 2001, **59**(1), 31-37.
 27. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**(5): 646–674.
 28. Waddington CH: The epigenotype. *Int J Epidemiol*, 1942 **41**(1):10–13.
 29. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones, PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, **429**(6990), 457.
 30. Taby R. ve Issa JPJ. Cancer epigenetics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2010 **60**(6), 376-392.
 31. Sharma S, Kelly TK., Jones PA. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36.
 32. Jones PA, ve Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 2002. **3**(6), 415.
 33. Kim K, Doi A., Wen B, Ng K., Zhao R., Cahan P, ve ark. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010 **467**(7313), 285.

34. Prendergast GC, Lawe D, Ziff EB. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell*, 1991. **65**(3), 395-407.
35. Antequera F, Boyes J, Bird A. High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell*, 1990, **62**(3), 503-514.
36. Busslinger M, Hurst J, Flavell RA.. DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell*, 1983 **34**(1), 197-206.
37. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM., Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American journal of human genetics*, 1991. **48**(5), 880.
38. Baylin SB, ve Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, **2000**. 16(4), 168-174.
39. Costello JF, Frühwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, ve ark. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature genetics*, 2000, **24**(2), 132.
40. Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human genetics*, 1989. **83**(2), 155-158.
41. Merlo A, Herman JG, Mao L., Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC., ve ark. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature medicine*, 1995. **1**(7), 686-692.
42. Gonzalez-Zulueta M, Bender CM., Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM ve ark. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer research*, 1995. **55**(20), 4531-4535.
43. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC ve ark. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature medicine*, 1995. **1**(7), 686-692.
44. Feinberg AP ve Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983, **111**(1), 47-54.

45. Kisseljova NP ve Kisseljov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochem.* 2005, **70**(7), 743-752.
46. Feinberg AP, ve Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews. Cancer*, 2005 **4**(2), 143.
47. Samy MD, Yavorski JM, Mauro JA, Blanck G. Impact of SNPs on CpG Islands in the MYC and HRAS oncogenes and in a wide variety of tumor suppressor genes: A multi-cancer approach. *Cell Cycle*. 2016 **15**(12):1572-8.
48. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, ve ark. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 1998, **280**(5366), 1077-1082.
49. Kwok PY. *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods And Protocols*. Springer Science- Business Media. 2003
50. Degner JF, Pai AA, Pique-Regi R, Veyrieras JB, Gaffney DJ, Pickrell JK, ve ark. DNaseI sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. *Nature*, 2012, **482**(7385), 390.
51. Tycko B. Allele-specific DNA methylation: beyond imprinting. *Hum mol genet*, 2010, **19**(2), 210-220.
52. HM Tucker. *The Larynx*. New York, Thieme Medical Publishers Inc, 1987.
53. Guénel P, Chastang JF, Luce D, Leclerc A, Brugère J. A study of the interaction of alcohol drinking and tobacco smoking among French cases of laryngeal cancer. *J Epidemiol*, 1988, **12**(4), 350-354.
54. Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncol*, 1996 **32**(5), 293-305.
55. Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin. Oncol*. 1994, **21**, 281-288.
56. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D ve ark. Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *Epidemiol Rev*. 2007, **165**(7), 814-820.
57. Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia, C. Mechanisms of disease: the epidemiology of bladder cancer. *Nat Rev. Urol*, 2006, **03**(6), 327.

58. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Hollenbeck AR., chatzkin, A. Prospective investigation of the cigarette smoking–head and neck cancer association by sex. *Cancer*, 2007, **110**(7), 1593-1601.
59. Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit, R. P., Brennan, P., ve ark. Indoor air pollution from solid fuels and risk of hypopharyngeal/laryngeal and lung cancers: a multicentric case–control study from India. *Int J Epidemiol*, 2008, **37**(2), 321-328.
60. Elwood, J. M., Pearson, J. C. G., Skippen, D. H, Jackson, S. M. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Epidemiol*, 1984, **34**(5), 603-612.
61. Koufman, J. A., Radomski, T. A., Joharji, G. M., Russell, G. B., Pillsbury, D. C. Laryngeal biomechanics of the singing voice. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1996, **115**(6), 527-537.
62. D'souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Gillison, M. L. Case–control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2007, **356**(19), 1944-1956.
63. Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., Franceschi, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, **14**(2), 467-475.
64. Ragin, C. C. Making comparative analysis count. *Revista de História Comparada*, 2007, **1**(1).
65. Hobbs, C. G. L., Sterne, J. A. C., Bailey, M., Heyderman, R. S., Birchall, M. A., Thomas, S. J. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, 2006, **31**(4), 259-266.
66. Loyo, M., ve Pai, S. I. The molecular genetics of laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2008, **41**(4), 657-672.
67. Shangina, O., Brennan, P., Szeszenia-Dabrowska, N., Mates, D., Fabiánová, E., Fletcher, T., ve ark. Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Epidemiol Rev*. 2006, **164**(4), 367-375.
68. Stell, P. M., ve McGill, T. Asbestos and laryngeal carcinoma. *The Lancet*, 1973, **302**(7826), 416-417.

69. Dietz, A., Klapdor-Kleingrothaus, H. V., Krivosheina, I. V., Chkvorets, O. Search for neutrinoless double beta decay with enriched ^{76}Ge in Gran Sasso 1990–2003. *Phys Lett B*. 2004 **586**(3), 198-212.
70. Flanders, W. D., ve Rothman, K. J. Occupational risk for laryngeal cancer. *Am J Public Health*, 1982, **72**(4), 369-372.
71. Oreggia, F., De Stefani, E., Boffetta, P., Brennan, P., Deneo-Pellegrini, H., Ronco, A. L. Meat, fat and risk of laryngeal cancer: a case-control study in Uruguay. *Oral oncol*, 2001, **37**(2), 141-145.
72. Galli, J., Cammarota, G., Calo, L., Agostino, S., D'Ugo, D., Cianci, R., ve ark. The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 2002, **112**(10), 1861-1865.
73. Ferlito, A., Devaney, K. O., Woolgar, J. A., Slootweg, P. J., Paleri, V., Takes, R. P., ve ark. Squamous epithelial changes of the larynx: diagnosis and therapy. *Head Neck*, 2012, **34**(12), 1810-1816.
74. Chu, E. A., ve Kim, Y. J. Laryngeal cancer: diagnosis and preoperative work-up. *Otolaryngol Clin North Am*, 2008, **41**(4), 673-695.
75. Breda, E., Catarino, R., Monteiro, E. Transoral laser microsurgery for laryngeal carcinoma: Survival analysis in a hospital-based population. *Head neck*, 2015, **37**(8), 1181-1186.
76. Sessions, D. G. Surgical pathology of cancer of the larynx and hypopharynx. *The Laryngoscope*, 1976, **86**(6), 814-839.
77. Singh, B., Bhaya, M., Stern, J., Roland, J. T., Zimble, M., Rosenfeld, R. M., ve ark. Validation of the Charlson Comorbidity Index in patients with head and neck cancer: a multi-institutional study. *The Laryngoscope*, 1997, **107**(11), 1469-1475.
78. Mayne, S. T., Morse, D. E., Winn, D. M. Cancers of the oral cavity and pharynx. *Cancer epidemiol prev*. 2009, Oxford University Press.
79. Di Martino, E., Sellhaus, B., Hausmann, R., Minkenber, R., Lohmann, M., Esthofen, M. W. Survival in second primary malignancies of patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol*, 2002, **116**(10), 831-838.
80. Yilmaz, T., Hosal, A. S., Gedikoğlu, G., Önerci, M., Gısel, B. (1998). Prognostic significance of vascular and perineura invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol*, 1998, **19**(2), 83-88.

81. Reddy, S. P., Gopal, R. G., Sita, L. G. In vitro multiplication of *Gymnema sylvestre* R. Br.–An important medicinal plant. *Current Science*, 1998, **75**(8), 843-845.
82. Fein, D. A., Lee, W. R., Hanlon, A. L., Ridge, J. A., Langer, C. J., Curran Jr, W. J., Coia, L. R. Pretreatment hemoglobin level influences local control and survival of T1-T2 squamous cell carcinomas of the glottic larynx. *J Clin Oncol*. 1995, **13**(8), 2077-2083.
83. Forastiere, A. A., Goepfert, H., Maor, M., Pajak, T. F., Weber, R., Morrison, W. ve ark. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med.*, 2003, **349**(22), 2091-2098.
84. SEER; Bethesda (MD): National Cancer Institute. (İnternette), Erişim: 12.,6.2017, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/
85. Groome, P. A., O'sullivan, B., Irish, J. C., Rothwell, D. M., Schulze, K., Warde, P. R ve ark. Management and outcome differences in supraglottic cancer between Ontario, Canada, and the Surveillance, Epidemiology, and End Results areas of the United States. *J Clin Oncol*, 2003, **21**(3), 496-505.
86. Groome, P. A., O'sullivan, B., Irish, J. C., Rothwell, D. M., Schulze, K., Warde, P. R., ve ark. Management and outcome differences in supraglottic cancer between Ontario, Canada, and the Surveillance, Epidemiology, and End Results areas of the United States. *J Clin Oncol*, 2003, **21**(3), 496-505.
87. Gao, X., Fisher, S. G., Mohideen, N., Emami, B. Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, **56**(2), 427-435.
88. Hermans, R. Staging of laryngeal and hypopharyngeal cancer: value of imaging studies. *Eur Radiol*, 2006, **16**(11), 2386-2400.
89. Thabet, H. M., Sessions, D. G., Gado, M. H., Gnepp, D. A., Harvey, J. E, Talaat, M. Comparison of clinical evaluation and computed tomographic diagnostic accuracy for tumors of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope*, 1996, **106**(5), 589-594.
90. Edge, S., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., Trotti III, A. *Part III, Digestive system. American Joint Committee on Cancer Staging Manual* (7th Edn). New York, Springer, 2010,

91. Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci*, 1971, **68**(4), 820-823.
92. Fearon, E. R., ve Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, **61**(5), 759-767.
93. Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., ve ark. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 1996, **56**(11), 2488-2492.
94. Gollin, S. M. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head neck*, 2001, **23**(3), 238-253.
95. Carey, T. E., Van Dyke, D. L., Worsham, M. J. Nonrandom chromosome aberrations and clonal populations in head and neck cancer. *Anticancer Res*, 1993, **13**(6), 2561-2567.
96. Jin, Y., Mertens, F., Mandahl, N., Heim, S., Olegård, C., Wennerberg, J., ve ark. Chromosome abnormalities in eighty-three head and neck squamous cell carcinomas: influence of culture conditions on karyotypic pattern. *Cancer Res*, 1993, **53**(9), 2140-2146.
97. Rosin, M. P., Cheng, X., Poh, C., Lam, W. L., Huang, Y., Lovas, J., ve ark. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*, 2000, **6**(2), 357-362.
98. Bosch, F. X., Ritter, D., Enders, C., Flechtenmacher, C., Abel, U., Dietz, A., ve ark. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer*. 2004, **111**(4), 530-538.
99. Chen, G. X., Zhang, S., He, X. H., Liu, S. Y., Ma, C., Zou, X. P. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *OncoTargets and therapy*, 2014, **7**, 1901.
100. Jourenkova-Mironova, N., Voho, A., Bouchardy, C., Wikman, H., Dayer, P., Benhamou, S., Hirvonen, A. Glutathione S-transferase GSTM3 and GSTP1 genotypes and larynx cancer risk. *Cancer Epidemiol Prev Bio*, 1999, **8**(2), 185-188.
101. Jahnke, V., Matthias, C., Fryer, A., Strange, R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am J Surg*, 1996, **172**(6), 671-673.

102. Jahnke, V., Matthias, C., Fryer, A., Strange, R. Glutathione S-transferase and cytochrome-P-450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am J Surg*, 1996, **172**(6), 671-673.
103. Reed, A. L., Califano, J., Cairns, P., Westra, W. H., Jones, R. M., Koch, W ve ark. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 1996 **56**(16), 3630-3633.
104. Temam, S., Bénard, J., Dugas, C., Trassard, M., Gormally, E., Soria, J. C ve ark. Molecular detection of early-stage laryngopharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(7), 2547-2551.
105. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R., Green, S., Fiore, N., ve Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci*, 1975, **72**(9), 3666-3670.
106. Old, L. J. Tumor necrosis factor. *Sci Am*, 1988, **258**(5), 59-60.
107. Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., ve Lu, S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, 1988, **53**(1), 45-53.
108. Black, R. A., Sleath, P. R., ve Kronheim, S. R. Interleukin 1 β protease and interleukin 1 β protease inhibitors. U.S. Patent No. 5,416,013. 16 May 1995.
109. Moss, M. L., Jin, S. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., ve ark. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nat*, 1997, **385**(6618), 733.
110. Moss, M. L., Jin, S. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., ve ark. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nat*, 1997, **385**(6618), 733.
111. Tartaglia, L. A., Weber, R. F., Figari, I. S., Reynolds, C., Palladino, M. A., ve Goeddel, D. V. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, **88**(20), 9292-9296.
112. Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhdén, M., Clauss, M., Maxeiner, B., ve ark. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1995, **83**(5), 793-802.

113. Hohmann, H. P., Remy, R., Brockhaus, M., ve Van Loon, A. P. Two different cell types have different major receptors for human tumor necrosis factor (TNF alpha). *J Biol Chem*, 1989, **264**(25), 14927-14934.
114. Loetscher, H., Pan, Y. C. E., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., ve Lesslauer, W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1990, **61**(2), 351-359.
115. Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., ve ark. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, 1990 **61**(2), 361-370.
116. Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., ve ark. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Sci*, 1990, **248**(4958), 1019-1024.
117. Fiers, W. Tumor necrosis factor characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS*, 1991, 285(2), 199-212.
118. Tartaglia, L. A., ve Goeddel, D. V. Two TNF receptors. *Immunol Today*, 1992, **13**(5), 151-153.
119. Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Ulmer, A. J., Holst, O., Brade, H., ve ark. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiol*, 1993, **187**(3-5), 169-190.
120. Heumann, D., ve Roger, T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica chimica acta*, 2002, **323**(1), 59-72.
121. Verhoef, J., ve Mattsson, E. The role of cytokines in gram-positive bacterial shock. *Trends Microbiol*, 1995, **3**(4), 136-140.
122. Tuohy, V. K., Yu, M., Yin, L., Kawczak, J. A., Johnson, J. M., Mathisen, P. M. ve ark. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev*, 1998, **164**(1), 93-100.
123. Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001, **104**(4), 487-501.
124. Naismith, J. H., ve Sprang, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*, 1998, **23**(2), 74-79.
125. Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., ve ark. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-

- human TNF β complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, 1993, **73**(3), 431-445.
126. Loetscher, H., Stueber, D., Banner, D., Mackay, F., Lesslauer, W. Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biologic Chem*, 1993, **268**(35), 26350-26357.
127. van der Poll, T., Coyle, S. M., Barbosa, K., Braxton, C. C., Lowry, S. F. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest*, 1996, **97**(3), 713.
128. Tuma, R., Russell, M., Rosendahl, M., Thomas Jr, G. J. Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: structural effects of an engineered PEG linker. *Biochem*, 1995, **34**(46), 15150-15156.
129. Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., Goeddel, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 1993, **74**(5), 845-853.
130. Jiang, Y., Woronicz, J. D., Liu, W., Goeddel, D. V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Sci*, 1999, **283**(5401), 543-546.
131. Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., Goeddel, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 1996, **84**(2), 299-308.
132. Ting, A. T., Pimentel-Muinos, F. X., Seed, B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J*, 1996, **15**(22), 6189.
133. Chen, N. J., Chio, I. I. C., Lin, W. J., Duncan, G., Chau, H., Katz, D., ve ark. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, **105**(34), 12429-12434.
134. Micheau, O., ve Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003, **114**(2), 181-190.
135. Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G., Chen, Z. J. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol cell*, 2006, **22**(2), 245-257.

136. Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M., Ashwell, J. D. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol*, 2006, **8**(4), 398-407.
137. Blonska, M., Shambharkar, P. B., Kobayashi, M., Zhang, D., Sakurai, H., Su, B., Lin, X. TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor- α (TNF- α) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF- κ B activation. *J Biol Chem*, 2005, **280**(52), 43056-43063.
138. Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Sci*, 1998, **281**(5383), 1680-1683.
139. Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V. M., Goeddel, D. V. TRAF2-mediated activation of NF- κ B by TNF receptor 2 and CD40. *Sci*, 1995, **269**(5229), 1424-1426.
140. Thommesen, L., ve Læg Reid, A. Distinct differences between TNF receptor 1-and TNF receptor 2-mediated activation of NF κ B. *BMB Rep*, 2005, **38**(3), 281-289.
141. Matthews, N. Tumour-necrosis factor from the rabbit. III. Relationship to interferons. *British journal of cancer*, 1979, **40**(4), 534.
142. Prince, E. F., Frader, J., Bosk, C. On hedging in physician-physician discourse. *Linguistics Prof*, 1982, **8**(1), 83-97.
143. Haranaka K, Nobuko S, Akiko S. Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int J Cancer*. 1984, **34**(2): 263-267.
144. Ziegler-Heitbrock, H. L., Munker, R., Dörken, B., Gaedicke, G., Thiel, E. Induction of features characteristic of hairy cell leukemia in chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia cells. *Cancer Res*, 1986, **46**(4), 2172-2178.
145. Wajant, H., ve Scheurich, P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway. *FEBS*, 2011, **278**(6), 862-876.
146. O'Donnell, M. A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., Xavier, R., ve ark. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol*, 2011, **13**(12), 1437.

147. Muppidi, J. R., Tschopp, J., Siegel, R. M. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*, 2004, **21**(4), 461-465.
148. Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell*, 1995, **81**(4), 495-504.
149. Yeh, W. C., de la Pompa, J. L., McCurrach, M. E., Shu, H. B., Elia, A. J., Shahinian, A., ve ark. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Sci*, 1998, **279**(5358), 1954-1958.
150. Takada, H., Chen, N. J., Mirtsos, C., Suzuki, S., Suzuki, N., Wakeham, A., ve ark. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(11), 4026-4033.
151. Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 1994, **78**(4), 681-692.
152. Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltseve, Y. V., Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 1996, **85**(6), 803-815.
153. Vince, J. E., Pantaki, D., Feltham, R., Mace, P. D., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., ve ark. TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (TNF) to efficiently activate NF- κ B and to prevent TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2009, **284**(51), 35906-35915.
154. Darzynkiewicz, Z., Williamson, B., Carswell, E. A., Old, L. J. Cell cycle-specific effects of tumor necrosis factor. *Cancer Res*, 1984, **44**(1), 83-90.
155. Austgulen, R., Espevik, T., Hammerstrøm, J., Nissen-Meyer, J. Role of monocyte cytotoxic factor in cytolysis of actinomycin D-treated WEHI 164 cells mediated by freshly isolated human adherent mononuclear blood cells. *Cancer Res*, 1986, **46**(9), 4566-4570.
156. Sedger, L. M., ve McDermott, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, **25**(4), 453-472.

157. Pergoli, L., Favero, C., Pfeiffer, R. M., Tarantini, L., Calista, D., Cavalleri, T., ve ark. Blood DNA methylation, nevi number, and the risk of melanoma. *Melanoma Res*, 2014, **24**(5), 480-487.
158. Devaney, J. M., Wang, S., Funda, S., Long, J., Taghipour, D. J., Tbaishat, R., ve ark. Identification of novel DNA-methylated genes that correlate with human prostate cancer and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013, **16**(4), 292.
159. Kim, J. H., Kang, S., Kim, T. W., Yin, L., Liu, R., Kim, S. J. Expression profiling after induction of demethylation in MCF-7 breast cancer cells identifies involvement of TNF- α mediated cancer pathways. *Mol Cells*, 2012, **33**(2), 127-133.
160. Ho, S. Y., Wang, Y. J., Chen, H. L., Chen, C. H., Chang, C. J., Wang, P. J., ve ark. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor- α promoter gene. *Cancer Causes Control*, 2004, **15**(7), 657-663.
161. Shin, S. P., Kim, N. K., Kim, J. H., Lee, J. H., Kim, J. O., Cho, S. H., ve ark. Association between hepatocellular carcinoma and tumor necrosis factor alpha polymorphisms in South Korea. *World J Gastroenterol*, 2015, **21**(46), 13064.
162. Chinchai, T., Homchan, K., Sopipong, W., Chansaenroj, J., Swangvaree, S., Junyangdikul, P., ve ark. Lack of Associations between TNF-alpha Polymorphisms and Cervical Cancer in Thai women. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, **17**, 953-956.
163. Kesarwani, P., Mandhani, A., Mittal, R. D. Polymorphisms in tumor necrosis factor-A gene and prostate cancer risk in North Indian cohort. *J Urol*, 2009, **182**(6), 2938-2943.
164. Ahirwar, D. K., Agrahari, A., Mandhani, A., Mittal, R. D. Cytokine gene polymorphisms are associated with risk of urinary bladder cancer and recurrence after BCG immunotherapy. *Biomarkers*, 2009, **14**(4), 213-218.
165. Kapitanović, S., Čačev, T., Ivković, T. C., Lončar, B., Aralica, G. TNF α gene/protein in tumorigenesis of sporadic colon adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*, 2014, **97**(2), 285-291.

166. Deshpande, A., Nolan, J. P., White, P. S., Valdez, Y. E., Hunt, W. C., Peyton, C. L., Wheeler, C. M. TNF- α promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J Infect Dis*, 2005, **191**(6), 969-976.
167. Naderi N, Farnood A, Dadaei T, Habibi M, Balaii H, Firouzi F, Mahban A, Soltani M, Zali M. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease in Iran. *Iran J Public Health*. 2014, **43**(5):630-6.
168. Yang Y, Feng R, Bi S, Xu Y. TNF-alpha polymorphisms and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011, **129**(2):513-9.
169. Kapitanović S, Čačev T, Catela Ivković T, Lončar B, Aralica G. TNF α gene/protein in tumorigenesis of sporadic colon adenocarcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2014, **97**(2):285-91.
170. Bhayal AC, Krishnaveni D, RangaRao KP, Bogadi V, Suman C, Jyothy A, Nallari P, Venkateshwari A. Role of tumor necrosis factor- α -308 G/A promoter polymorphism in gastric cancer. *Saudi J Gastroenterol*. 2013, **19**(4):182-6.

HAM VERİLER

FORMLAR

1-A GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME FORMU

1. Çalışmanın Adı:

Larenks kanserli hastalarda *TNFA* geninin promoter bölgesindeki polimorfik değişiklikler ile metilasyon ve ekspresyon durumlarının incelenmesi

2. Çalışmanın Amacı:

Larenks kanserinde *TNFA* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri ile promoter bölgesindeki polimorfik farklılıkların hastalığın erken tanı ve tedaviye yanıtının izlenmesine olanak verecek biyomarker potansiyelinin araştırılması.

3. Çalışmanın Açıklanması:

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran ameliyat tarihinden önce onayı alınarak çalışmaya katılım için bilgilendirilmiş, gönüllü onamları alındıktan sonra hekimlerce zaten hastalıkları sebebiyle ameliyatlarına karar verilen larenks kanseri tanısı almış 50 hastadan ameliyat öncesinde alınacak serum(7-10 cc) ve tükürük(20mL) örnekleri ile ameliyat sırasında alınacak 0,5 cm büyüklüğünde tümör ve eşlenik normal doku hem metilasyon/ekspresyon hem de polimorfizm deneylerinde kullanılmak üzere toplanacaktır. Ayrıca çalışmamızda **sağlıklı kontrol** olarak kendisi ve ailesinde benin veya malin hikayesi bulunmayan; metilasyon/ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvurmuş horlama cerrahisi (uvulopalatopharyngoplasty (UPPP)) uygulanmasına zaten hekimlerce karar verilmiş 20 sağlıklı bireye ait ameliyat sırasında alınacak 0,5 cm normal doku, ameliyat öncesinde alınacak serum (7-10 cc) ve tükürük (20mL) örnekleri toplanacaktır.

Tüm örneklerden laboratuvar koşulları altında öncelikle periferik kandan serum ve lenfosit ayrılması ve serum, lenfosit ve tükürük örneklerinden elde edilecek hücrelerden ve normal ile tümör dokularından fenol/kloroform ekstrasyonu metodu ile DNA elde edilecek ve sonra DNA'ların elektroforetik kalite kontrolü yapılacak ve spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilecektir. Daha sonra elde edilen DNA örneklerinden restriksiyon enzim kesimi tekniği ile PCR yöntemi uygulanacak ve sonuçlar değerlendirilecektir. **Bahsedilen tüm uygulamalar kesinlikle hasta üzerinde değil, hastaya ait materyal üzerinde ve laboratuvar**

ortamında gerçekleştirilecektir. Hasta üzerinde hasta ile direk bir çalışma olmadığından çalışmanın herhangi bir riski bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçlar, hastaların klinik ve patolojik bulgularıyla ilişkileri açısından değerlendirilerek bunların klinikte birer marker olarak kullanılabilirliği araştırılacaktır.

4. Çalışmanın Planlanan Süresi, Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.02.2016-01.02.2018

5. Açıklamalar: Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar verirseniz bu bilgilendirilmiş onay olur (onay) formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın bu temel bilim araştırmasına ameliyat esnasında alınacak doku materyaliniz ve doktorunuza danışılarak bir hemşire tarafından alınacak 7-10 cc.'lik kan ve 20 mL tükürük örneğiniz ile katılacaksınız. Kan alma sırasında kan alınan bölgede acı, morarma, kanama ya da diğer rahatsızlıklar meydana gelebilir, fakat bu güçlüklerin en aza indirilmesi için gereken önlemler alınacaktır. Sizden ayrıca araştırmaya yardımcı olacak bazı kişisel bilgileriniz istenebilir. Bilgilerinizin gizliliği uygulanmakta olan yasalar ve yönetmeliklerin izin verdiği ölçüde kullanılacaktır. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki kişisel medikal bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için gereken verilerin toplanması ve işlenmesiyle sınırlı olacaktır. Mutlak gizlilik garanti edilemez. Araştırma amaçlı bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda ya da yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda sizin kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırma ile ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Katılmaya karar verdikten sonra da herhangi bir zamanda bu çalışmaya katılma için olurunuzu geri çekebilir ve çalışmadan çıkabilirsiniz. Bu karar medikal tedavinizi etkilemeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya katılmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasına konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız takdirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız.

Herhangi bir soru ya da sorun olduğu takdirde ilgili araştırmacıya (Uzm.Dr. Murat Ulusan veya Dr. Can Doruk) İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz A.B.D. 0212 414 20 00 / 31674 nolu telefondan ulaşabilirsiniz.

1-B- GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Gönüllünün/Katılımcının/Hastanın Beyanı: Sayın Uzm.Dr. Murat Ulusan veya Dr. Can Doruk tarafından İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ABD'de tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Uzm.Dr. Murat Ulusan veya Dr. Can Doruk'u, 02124142000 / 31674 nolu telefon ve İstanbul Tıp Fakültesi, KBB Hastalıkları ABD'dan arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...) Tarih

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası Tarihi

**Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı,
İmzası, Görevi**

XXXXXX

ETİK KURUL KARARI





T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1946

Tarih : 30.11.2015

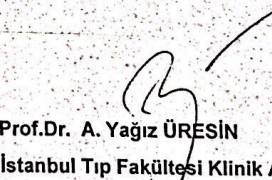
Konu : Doç. Dr. Semra DEMOKAN

Sayın Doç. Dr. Semra DEMOKAN
Onkoloji Enstitüsü

İli : Onkoloji Enstitüsünün 20/07/2015 gün ve 229314 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Sevde CÖMERT' in yürüteceği 2015/1874 dosya numaralı "Larenks kanserli hastalarda TNFA geninin promotör bölgesindeki polimorfik değişiklikler ile metilasyon ve ekspresyon durumlarının incelenmesi" başlıklı çalışma kurumumuzun 27/11/2015 tarih ve 20 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itifetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Larenks kanserli hastalarda TNFA geninin promotör bölgesindeki polimorfik değişiklikler ile metilasyon ve ekspresyon durumlarının incelenmesi"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Semra DEMOKAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Temel Onkoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Diğer ise belirtiniz :				
	TEK MERKEZ	ÇOK MERKEZLİ	ULUSAL	ULUSLAR ARASI	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU				
KARARININ AÇIK ADI		"Larenks kanserli hastalarda TNFA geninin promoter bölgesindeki polimorfik değişiklikler ile metilasyon ve ekspresyon durumlarının incelenmesi"		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	05/11/2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>		Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	<input type="checkbox"/>	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:20	Tarih: 27/11/2015		
	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde görevli Doç. Dr. Semra DEMOKAN sorumluluğunda ve Yüksek Lisans Öğrencisi Sevdâ CÖMERT' in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI

- * :Araştırma ile ilişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmî Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığında izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığının iznine tabi değildir.

PATENT HAKKI İZİNİ



TELİF HAKKI İZİNİ

