T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

LARİNKS KANSERLİ HASTALARDA DNA TAMİR GENİ POLİMORFİZİMNİN PCR-RFLP YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ziyaeddin İNAN

Danışman
Prof. Dr. Hasan ACAR

KONYA – 2008

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

SABE PROJE NO: 06202021

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LARİNKS KANSERLİ HASTALARDA DNA TAMİR GENİ POLİMORFİZİMNİN PCR-RFLP YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Ziyaeddin İNAN

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 31/01/2008 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği* ile kabul edilmiştir.
(S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No: .....)

Tez Jürisi : Jüri başkanı Prof. Dr. Hasan ACAR .....

Danışman: Prof. Dr. Hasan ACAR .....

Üye Doç.Dr. Tülin ÇORA .....

Üye Doç.Dr. Ali ÜNLÜ .....

I

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ ……1
2. LİTERATUR ÖZETİ……..……3
2.1. Larinks ve Larinks Kanserleri……...…….....3
2.1.1. Larinks Anatomisi……...…… 3
2.1.2. Larinks Kanserleri ve Patogenezi…….....4
2.1.3. Larinks Kanserlerinin TNM Sınıflandırılması……...……...…...6
2.2. DNA Hasarları ve Kanser…….6
2.2.1. DNA Hasarları……..6
2.2.2. DNA Hasarlarının Tamiri ve Tamir Genleri ……...……...…...….7
2.2.2.1. Eksizyon Tamiri…….....…….7
2.2.2.1.1. Baz Eksizyon (BER) Tamiri……..…….7
2.2.2.1.1.1. BER Mekanizmasında *XRCC1* Geni ve Arg399Gln Polimorfizminin Önemi…….....8
2.2.2.1.2. Nükleotid Eksizyon (NER) Tamiri……..…….10
2.2.2.1.2.1 NER Mekanizmasında *XPD* Geni ve Lys751Gln Polimorfizminin Önemi……...……14
3. MATERYAL ve METOD…….…….……16
3.1. Hasta Seçimi ve Kontrol Grubu…….....……...16
3.2. DNA İzolasyonu……...…….16
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)……... …….17
3.4. Jel Elektroforezi……...……...18
3.5. Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi ve Genotipleme……...……..18
3.6. İstatistiksel Analizler……...……..……20
4. BULGULAR……..……...……..21

4.1. Birleştirilmiş Genotipler ile Gruplar Arasındaki İlişki……..……25

4.2. Yaş ile Genotipler Arasındaki ilişki……..……25

4.3. Sigara Alışkanlığı ile Genotipler Arasındaki İlişki…….……26

4.4. Tümör Lokalizasyonu ile Genotipler Arasındaki İlişki……..…26

4.5. TNM Sınıflandırmasıyla Genotipler Arasındaki İlişki……..……27

5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..…….28

6. ÖZET……...32

7. YABANCI DİLDE ÖZET (SUMMARY)…….33

8. LİTERATÜR LİSTESİ……...…34

9. EKLER……...…44

10. ÖZGEÇMİŞ……...…45

11. TEŞEKKÜR……...…46

III

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Larinksin boyun bölgesindeki lokalizasyonu..... 3

Şekil 2. Larinksin boyuna kesiti ve anatomik bölgeleri..... 4

Şekil 3. Özetlenmiş BER mekanizması.....8

Şekil 4. *XRCC1* gen ürününün DNA hasarı olan bölgedeki lokalizasyonu 9

Şekil 5. Özetlenmiş NER mekanizması.....11

Şekil 6. NER tamir yolunun genel mekanizması ve *XPD* gen ürününün oluşturduğu protein kompleksi 13

Şekil 7. *XRCC1* Arg399Gln ve *XPD* Lys751Gln polimorfizimlerindeki genotiplerin gösterildiği agaroz jel fotografı ……..……..……..…22

IV

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminin farklı toplumlardaki genotip ve allel frekansı dağılımı.....10

Tablo 2. BER mekanizmasında yer alan genler, lokalizasyonları ve özet fonksiyonları.....11

Tablo 3. Farklı popülasyonlardaki *XPD Lys751Gln* polimorfizmi allel frekansları.....15

Tablo 4. *XRCC1 (Arg399Gln)*, XPD *(Lys751Gln)* polimorfik bölgelerinin genotip dağılımları açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması.....23

Tablo 5. Hasta ve kontrol grublarında *XRCC1 (Arg399Gln)* ve XPD *(Lys751Gln)* polimorfik bölgelerinin alleldağılımı.....24

Tablo 6. *XRCC1 (Arg399Gln)* ve *XPD (Lys751Gln)* polimorfik yapılarının ve birleştirilmiş genotiplerinin yaş, sigara ve TNM gruplarındaki dağılımı (Ek.1)……44

V

KISALTMALAR

TNP : Tek nükleotid polimorfizmi

ÇSTD : Çeşitli sıklıkta tandem tekrarlayan diziler

BER : Base exision repair (Baz cıkarma tamiri)

NER : Nucleotide exision repair (Nükleotid çıkarma tamiri)

***XRCC1* :** X-Ray Repair Cross-Complementing 1

***XPD* :** Xredoderme Pigmentosum grup D

LSHK : Larengeal skuamoz hücreli karsinom

ACS : American Cancer Society

PAH : Polisiklik aromatik hidrokarbonlar

SOR : Serbest oksijen radikalleri

PARP : Poly-ADP-riboz polimeraz

GGT : Genel genom tamiri

TBT: Transkripsiyona bağlı tamir

XP: Xeroderma Pigmentosum

CS : Cockayne Sendromu

TTD : Trikotiyodistrofi

ERCC : Excision Repair Cross Complementing

XPC/hHR23B : Xeroderma pigmentosum protein Group C-human homolog of RAD23B

RFUP-(RFLP) : Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bç : Baz çifti

TFIIH : Transkripsiyon faktörü II H

RPA : Replikasyon proteini A

CHO : Chines Hamster Overy

TAE : Tris, Asetik asit ve EDTA

EtBr : Ethidium Bromür

Bu tezin hiçbir bölümünde, kaynak gösterilmeden başka bir çalışmadan tamamen veya kısmen alıntı yapılmadığını, alınan bilgilerin ise kaynağının refarans olarak gösterildiğini beyan ederim.

31.01.2008

Ziyaeddin İNAN

1. GİRİŞ

Dünyada ölüm sebepleri içerisinde ilk sıralarda yer alan, önemli ve yaygın bir sağlık sorunu olan kanser, hücre çoğalmasındaki kontrolün kaybı olarak tarif edilebilir. Son zamanlarda moleküler genetik ve biyolojik çalışmalar bu kontrolün ortadan kalkma mekanizmalarını yeni araştırmalar ile ortaya koymaktadır.

Larinks kanserleri baş boyun kanserleri içerisinde en sık gözlenen kanser türlerinden olup, larengeal skuamoz hücreli karsinom (LSHK) larinksin en yaygın görülen tümörüdür. Bu kanserlerin meydana çıkmasına sebep olan risk faktörlerinin önemli bir kısmının iyi bilinmesinden dolayı önlenebilmeleri mümkündür. Larengeal skuamoz hücreli karsinomda en önemli risk faktörü olarak sigara kullanımı gösterilmektedir. Yapılan çalışmalarda LSHK'lı bireyler arasında sigara kullanımının yaklaşık %95 gibi çok yüksek oranlara ulaştığı görülmektedir. Fakat her sigara kullanan bireyde de LSHK gelişmesi görülmemektedir. Bu bireysel farklılığın nedeni olarak genetik yapı varyasyonlarının kanserogenezis üzerinde farklı etki ve rollerinin olduğunu düşündürmektedir.

Kanser, hücrenin temel moleküler seviyedeki düzenleyici mekanizmalarındaki hatalardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Sigara ve sigaradaki bileşenlerin genomik DNA da başta tek ve çift zincir kırıkları olmak üzere çeşitli hasarlara neden olduğu bilinmektedir. Oluşan bu hasarlar; genetik bilginin doğru olarak ifade edilmesinde ve yavru döllere aktarılmasında büyük role sahip olan DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilir. Bu mekanizmaların sağlıklı çalışması, kanser ve genetik hastalıklardan korunmada önemli yere sahiptirler. Bu tamir işlemlerinde görev alan birçok gende yapısal değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu değişikliklerin birkısmını ise genlerdeki çeşitli polimorfik yapılar (tek nükleotid polimorfizleri (TNP) veya çeşitli sıklıkta tandem tekrarlayan (ÇSTD) dizi polimorfizmleri) oluşturmaktadır. Tamir genlerinin nükleotid dizilerindeki (TNP) polimorfik yapılar; kodlanan protein ve enzimlerin aminoasid dizilimlerini değiştirdiklerinden dolayı fonksiyonel polimorfik yapılar olabilmektedir. Bu nedenle bu genlerdeki polimorfik değişiklikler DNA onarım kapasitelerinde önemli fonksiyonel değişimlere sebep olabilmekte ve dolayısıyla bireylerin çeşitli kanser tiplerine karşı hassasiyetlerini (yatkınlığını veya dirençliliğini) etkileyebilmektedir.

DNA zincir kırıklarının tamir edilmesinde rol oynayan proteinleri kodlayan *XRCC1* (X-Ray Repair Cross-Complementing) geninin *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmi ve tamir

esnasında gerekli zincir açılımını sağlayan helikazı kodlayan *XPD* (Xredoderme Pigmentosum D) geninin *XPD Lys751Gln* polimorfizmi, özellikle sigara kullanımı ile ilişkilendirilen kanserlerde önemli rol oynadıkları düşünülen polimorfik yapılardır.

Bu genler, eksizyon tamir mekanizmasının iki üyesi olan BER (Base exision repair) ve NER (Nucleotide exision repair) tamir yollarında bulunan önemli genlerdendir. BER ve NER tamir mekanizmalarında rol alan bu genlerdeki fonksiyonel polimorfik bölgeler ile LSHK etiyolojisi arasındaki ilişkiyi inceleyen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Larengeal skuamoz hücreli karsinomda bu riskli polimorfizimlerin belirlenmesi; LSHK'nın moleküler temelinde polimorfik bölgeleri bulunan bu iki genin fonksiyonel etkilerinin olup olmadığı ortaya konacaktır. Elde edilen bulgulara göre çevresel faktörlerin yanı sıra, tamir mekanizmasında rol alan bu iki genin polimorfik bölgelerinin risk faktörü olarak belirlenmesi hastalığın gelişmesi ve prognozu açısından yol gösterici olabilir. Ayrıca bu çalışma genetik temelinde hangi genlerin rol aldığı bilinmeyen LSHK'nın moleküler temelinin ortaya konması için sonraki çalışmalara yön gösterme potansiyeli taşımasından dolayı önem arz etmektedir.

2. LİTERATUR ÖZETİ

2.1. LARİNKS VE LARİNKS KANSERLERİ

2.1.1. LARİNKS ANATOMİSİ

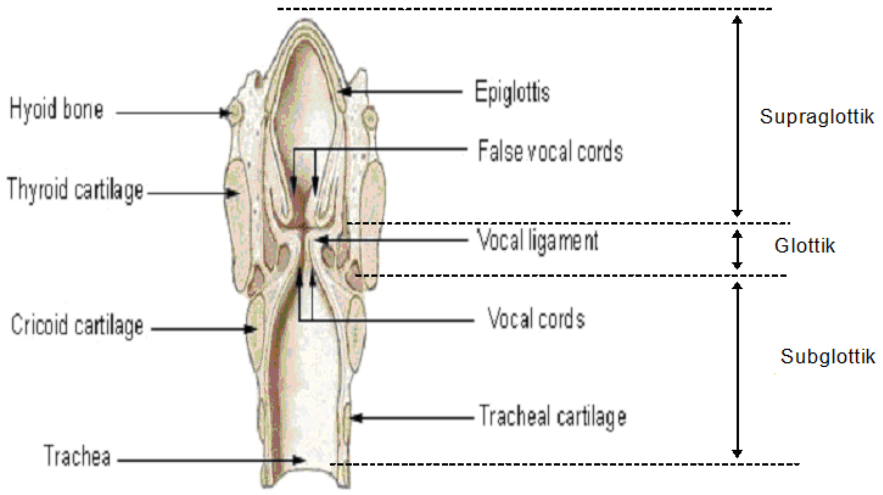
Larinks, 3. ve 6. servikal vertebraların önünde yer alan, pulmoner sistemin girişini kontrol eden, mobilite özelliğine sahip, kuvvetli kas yapılı, kıkırdak, zar ve bağlardan meydana gelen, boşlukları mukoza ile örtülü önemli vazifeleri bulunan bir organdır (**Şekil 1**). Özellikle alt solunum yollarının korunmasında görevli olan bu mekanizmanın fonksiyonları incelendiğinde ses oluşumu, dolaşım, solunum ve intratorasik basıncın devamlılığında görev aldığı görülür (Kirchner ve Carter 1999, Engin ve Erişen 2003, Rosai 2004).



Şekil 1. Larinks'in boyun bölgesindeki lokakizasyonu.
http://www.orl.nl/Voice_Rehabilitation/Laryngeal_Cancer/Normal_Larynx/Normalbw.jpg 'den alınmıştır.

Anatomik olarak, larinks supraglottik, glottik ve subglottik olarak üç bölgeye ayrılmaktadır. Supraglottik bölge vokal kordların üstünde, glottik bölge her iki vokal kordun arasında, subglottik bölge ise vokal kordların altında yer almaktadır **(Şekil 2).** Laringeal kanserler, larinksin yapısının oluşumu ve fonksiyonlarının yerine getirilmesi açısından önemli olan bu anatomik yapılara göre sınıflandırılmaktadır (Becker ve ark 1993, Wenig BM 1993, Engin ve Erişen 2003).

Mukozal olarak solunum ve sindirim yollarının kavşak bölgesinde bulunan larinksin; ventriküler bandları, vokal kordları ve epiglottisin laringeal yüzeyi çok katlı non-kreatinize skuamoz epitel, diğer kısımları ise silyalı kolumnar epitel ile döşelidir (Kepekçi 1992, Becker ve ark 1993).



Şekil 2. Larinksin boyuna kesiti ve anatomik bölgeleri.
http://www.daviddarling.info/images/larynx.jpg' den alınmıştır.

2.1.2. LARİNKS KANSERLERİ VE PATOGENEZİ

Baş ve boyun bölgesi kanserleri tüm vücut kanserleri içerisinde önemli bir yer tutar. Skuamoz hücreli baş ve boyun kanserleri dünyada erkekler arasında en sık görülen altıncı kanser türüdür (Biolchini 2005). Larinks kanserleri baş boyun kanserleri içerisinde en sık gözlenen kanser türlerinden olup, skuamoz hücreli karsinom larinks' te en çok görülen tümör tipidir (Shah JP 1997, Elwood JM ve ark 1998).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre erkeklerde görülen kanserler arasında beşinci sırada olan larinks kanseri (Hamzaoğlu ve Ozcan 2006), son yıllarda değişmekle birlikte erkeklerde kadınlara oranla yaklaşık 4 kat daha fazla görülmektedir (Jemal ve ark 2007).

İlk belirtisi genellikle ses kısıklığı olan laryngeal kanserlerin diğer semptomları ise boğazda ağrı ve yabancı cisim hissi, disfoni, disfaji olup bunların tipi ve şiddeti tümörün anatomik yerleşimi ile ilişkilidir (Underwood 1996, Taxy 1996).

Larinks kanserlerinin yaklaşık %96'sı skuamoz hücre karsinomlarıdır. Bu tümörlerin %60'ından fazlası glottik, %5 den azı subglottik ve diğer kalan kısmı

supraglottik orjinlidir (Shah JP 1997). Larinks kanseri gelişimi ile ilgili olarak kişisel hijyenden gastroözofagial refluye kadar birçok etken gösterilmektir. Etiyolojide asbestoz, odun tozu, ağır metaller ile kömürün rol aldığını gösteren çalışmalar olması ile birlikte (Cann ve ark 1985, Maier ve ark 1992, Muscat ve Wynder 1992) sigara ve alkol kullanımının en önemli risk faktörü olduğu bilinmektedir (Dosemeci ve ark 1998, Jurkiewicz ve ark 2006). Yapılan çalışmalarda, LSHK'lı hastaların büyük bir kısmının sigara kullanıcısı ya da geçmişinde sigara kullanan 50 yaş üzeri bireylerden oluştuğu ve aynı zamanda önemli bir kısmının sigarayla beraber alkol kullandığı, bunun da tümör gelişiminde sinerjik etki oluşturduğu bildirilmektedir (Lewin ve ark 1998, Blot ve ark 1998, Muscat ve ark 1992, Maier ve ark 1992, Almadori ve ark 2005, Hashibe ve ark 2007).

LSHK'da en önemli risk faktörü olarak gösterilen sigaranın içerdiği polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, tütün spesifik nitrozaminler, serbest oksijen radikaller (SOR) ve bunların türevlerinin genomik DNA'nın bütünlüğüne zarar verdiği ve özellikle DNA zincir kırıklarına sebep olduğu bildirilmektedir (Kiyosawa ve ark 1990, Halliwell ve Cross 1994, Yoshie ve Ohshima 1997, Kodama ve ark 1997, Jałoszyński ve ark 2003). Larengeal skuamoz hücreli karsinomun meydana çıkışı ve hastalığın prognozu ile ilişkili kromozomal düzensizlikler (Szyfter ve ark 1999, Hermsen ark 2005), kromatid kırıkları (Gajecka M ve ark 2004) ve bazı gen delesyonlarının meydana geldiği (Li ve ark 2004) rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Bleomycin duyarlı DNA kırıkları testi ile laryngeal skuamoz hücre karsinomlu bireylerin lenfositlerinde, toplam kromatid kırıklarının, önemli derecede yüksek olduğu ve özellikle kromozom 1p22, 5q31, 6q23, 10q24 bölgelerinde kırıkların yoğunlaştığı bildirilmiştir (Gajecka ve ark 2004).

LSHK'nın gelişiminde, kimyasal ajanların zararlı etkilerini detoksifiye edici ve DNA kırıklarının tamirinde görev alan farklı genlerdeki polimorfik yapıların, kanser gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Pavanello ve Clonfero 2000, Gajecka ve ark 2004, Gajecka ve ark 2005, Biolchini F ve ark 2005, Acar H ve ark 2006, Peters ve ark 2006, Wen ve ark 2006). DNA' da meydana gelen tek ve çift zincir kırıklarının tamirinde rol alan *XPD* ve *XRCC1* genlerindeki polimorfizimler ile LSHK arasındaki ilişkiyi inceleyen çokaz sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların sonuçlarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir (Sturgis ve ark 1999, Olshan ve ark 2002, Varzim ve ark 2003, Gajecka ve ark 2005).

2.1.3. LARİNKS KANSERLERİNİN TNM (TÜMÖR, NODÜL ve METASTAZ) SINIFLANDIRILMASI

Her ne kadar larinks baş ve boyunun bir parçası olsada, sahip olduğu farklı özelliklerden dolayı American Cancer Society (ACS) tarafından oral kavide ve farinks kanserlerinden farklı olarak solunum sistemi kanserleri içerisinde sınıflandırılmaktadır (Jemal ve ark 2007, http://caonline.amcancersoc.org). Kanser lezyonu tanı ve direkt değerlendirmeden sonra "American Joint Committee on Cancer" e göre evrelendirilmektedir (AJCC 1997). Tümör evrelemesi, larinksin horizontal alanlarına göre yapılmaktadır. Nodal metastaz (N) evrelemesi nod boyutuna ve sayısına göre yapılır. Uzak metastaz (M) evrelemesi boyun ve larinksin ötesindeki lezyona göre yapılmaktadır.

2.2. DNA HASARLARI ve KANSER

2.2.1. DNA HASARLARI

DNA'nın bütünlüğü ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler, serbest oksijen radikalleri gibi birçok farklı çevresel ve endojen ajanlar sebebiyle sürekli tehdit altındadır. Bu ajanlar çeşitli baz modifikasyonları (deaminasyonlar, depürinasyonlar), tek ve çift DNA zincir kırıkları gibi farklı bir çok hasara sebep olmaktadır (Balajee ve Bohr 2000, de Boer ve Hoeijmakers 2000). DNA hasarı oluşturan ajanlardan en yaygını ve önlenebilir olanı sigaradır. Sigaranın gaz ve katran fazı polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), aromatik aminler, tütün spesifik nitrozaminler, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve türevleriyle beraber DNA hasarı oluşturabilen binlerce kanserojen madde içermektedir (Smoking and Health: A Report of Surgeon General US DHEW 1979, Kiyosawa ve ark 1990, Halliwell ve Cross 1994, Yoshie ve Ohshima 1997, Kodama ve ark 1997).

Serbest oksijen radikallerinin organizmadaki en önemli zararları ise DNA yapısında meydana getirmiş oldukları hasarlardır. Serbest radikallerin DNA ile etkileşimi sonucu baz modifikasyonları ve fosfodiester bağlarının hidrolizasyonu sonucunda da tek veya çift DNA zincir kırıkları oluşmaktadır (Halliwell ve Aruoma 1991, Cooke ve ark 2003).

Hücre içerisinde DNA hasarlarına karşı çeşitli metabolik yollar ile cevap verilerek, oluşan hasarlar tamir edilmeye çalışılır. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları ve apoptotik mekanizmalar burada önemli koruyucu roller üstlenmektedir. Düzeltilemeyen hasarlar hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücrenin programlı ölümüne sebep olur (Vispe ve ark 2000, Goode ve ark 2002). DNA hasarları tamir mekanizmalarıyla tamir

edilemez ve hasarlı hücre apoptoza gidemez ise mutasyonlara dolayısıyla, genomik kararsızlığa yol açabilmektedir. DNA yapısındaki bu önemli değişimler kanserin ve birçok kalıtsal hastalığın sebebini oluşturabilmektedir (Balajee ve Bohr 2000).

2.2.2. DNA HASARLARININ TAMİRİ ve TAMİR GENLERİ

Endojen ve ekzojen faktörler ile sürekli hasara uğratılan DNA da meydana gelen hasarların tiplerine göre farklı DNA tamir mekanizmaları devreye girer ve farklı yollarla tamir gerçekleştirilir. Bunlardan birincisi, DNA hasarı sonucu oluşan hatalı bazın çıkarıldığı BER (Base exision repair-baz çıkarma tamiri), ikincisi kusurlu nükleotitlerin grup halinde kesildiği NER (Nucleotide exision repair-nükleotid çıkarma tamiri), üçüncüsü ise yanlış eşleşme tamiri (mismatch) ve diğer biri ise rekombine tamir mekanizmaları olarak sınıflandırılmaktadır (Mohrenweiser ve Irene 1998). Bu tamir mekanizmalarında rol alan proteinleri kodlayan birçok gen, DNA tamir mekanizması genleri olarak tanımlanmıştır (Mohrenweiser ve ark 1989, Berwick ve Vineis 2000). Birçok gende olduğu gibi bazı DNA tamir genlerinin de nükleotid seviyesinde varyasyonlar, yani polimorfik yapılar gösterdiği bildirilmiştir (Shen ve ark 1998). DNA tamir genlerindeki bu polimorfik yapılar fonksiyonel olabilmektedir. Fonksiyonel olan bu genlerin ürünlerinde de farklılıklara, dolayısıyla tamir kapasitelerinde önemli değişimlere sebep olabilmektedir. Bu değişimler, mutasyonlardan farklı olarak, bireylerde kanser oluşturma riskini artırmakta veya önleyici etki yapabildiği bilinmektedir (Price ve ark 1997, Goode ve ark 2002). Literatürde DNA tamir genlerindeki polimorfizimler ile birçok kanser türü arasındaki ilişkiyi inceleyen çok sayıda araştırma ve bu çalışmalarla ilgili geniş derlemeler mevcuttur (Sturgis ve ark 2000, Stern ve ark 2001, Goode ve ark 2002, Smith ve ark 2003, Hu ve ark 2004, Terry ve ark 2004).

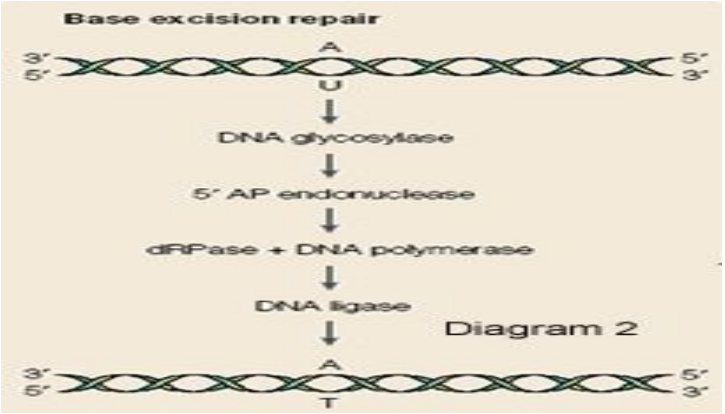
2.2.2.1. EKSİZYON TAMİRİ

Bu tamir mekanizmasında, modifikasyona uğramış, yanlış eşleşmiş bazlar DNA'dan kesilip çıkartılarak yerlerine doğru dizideki bazlar yerleştirilerek hasar giderilir. DNA eksizyon tamir mekanizması, BER (Base exision repair) ve NER (Nucleotide exision repair) olmak üzere ikiye ayrılır (Lindahl ve ark 1997).

2.2.2.1.1. BAZ EKSİZYON (BER) TAMİRİ

DNA da oluşan baz hasarları ve tek zincir kırıkları DNA tamir mekanizmalarından BER mekanizmasıyla tamir edilir. Bu tamir mekanizmasında birçok basamak vardır ve her adımda farklı proteinlerin aktivitesi sonucu hasar tamir edilir (Wilson ve Thompson

1997). BER tamir yolunda DNA glikosilaz (3-methyladenine DNA glycosylase), apürinik-apirimidinik endonükleaz gibi enzimler görev almaktadır (Balajee ve Bohr 2000). Bu mekanizmanın ilk adımında modifiye nükleotidin deoksiriboz şekeri ile baz arasındaki glikozidik bağı koparan DNA glikozilaz enzimi, apürinik yada apirimidinik bir bölgenin oluşmasına sebep olur ve daha sonra geride kalan deoksiriboz kısmı uzaklaştırılır. Oluşan bu boşluk, DNA polimeraz I tarafından doldurulduktan sonra DNA ligaz ile bağlantı tamamlanır (Lindahl ve ark 1997, Balajee ve Bohr 2000, Goode ve ark 2002) (**Şekil 3**).

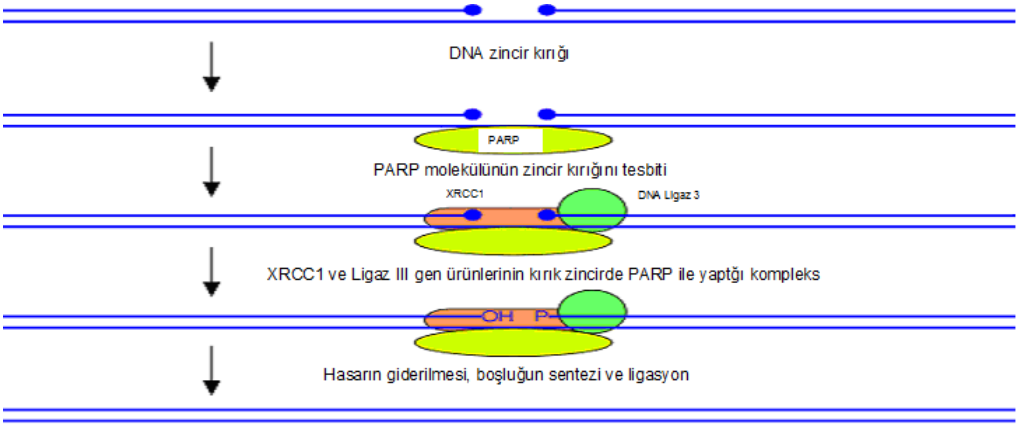


Şekil 3. Şematik BER mekanizması. http://people.bath.ac.uk/pr1cemb/DNAdamage.htm'den alınmıştır.

2.2.2.2.1.1.1. BER MEKANİZMASINDA *XRCC1* GENİ ve *Arg399Gln* POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ

XRCC1 (X-ray repair cross-complementing 1) geni iyonize radyasyonun, serbest radikallerin ve alkilleyici ajanların oluşturduğu, DNA tek zincir kırıklarını tamir eden BER mekanizmasının bir üyesidir (Thompson ve ark 1990, Zdzienicka 1995, Shen ve ark 1998). Bu gen, kromozom 19q13.2–13.3 bölgesinde lokalize olmuştur (Mohrenweiser ve ark 1989). *XRCC1* gen ürünü DNA Ligaz III, Plimeraz β ve merkez kısmında DNA zincir kırıklarını denetleyen poly-ADP-riboz polimeraz (PARP) ile ilişkili olan önemli bir BER DNA tamir mekanizması genidir (Kubota ve ark 1996, Nash ve ark 1997, Mason ve ark 1998). Yapılan deneysel bir çalışmada mutasyona uğramış *XRCC1* geni taşıyan hücrelerde iyonize radyasyon, UV, hidrojen peroksit ve mitomisin C maruziyetinde; hücrelerde DNA hasarlarının arttığı gösterilmiştir (Thompson ve West 2000). Shen ve arkadaşları (1998) ise *XRCC1* geninde *Arg194Trp*, *Arg280His* ve *Arg399Gln* olmak üzere üç polimorfizm olduğunu rapor etmişlerdir.

XRCC1 geninin 10. exonunun, 399. kodonun'da Guanin nüklotidinin Adenin nüklotide dönüşmesi (G→A) sonucunda meydana gelen yapısal değişim Arg amino asidi yerine Gln aminoasidinin sentezlenmesine sebep olan fonksiyonel bir polimorfizimdir (Shen ve ark 1998, Matullo ve ark 2006). *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminin olduğu bölge, DNA zincir kırıklarını denetleyen poly-ADP-riboz polimeraz (PARP) molekülüyle *XRCC1* geninin kompleks oluşturduğu bölge olması nedeni ile DNA tamir kapasitesi açısından kritik önem arz etmektedir (Hu ve ark 2001, Duell ve ark 2002, Lei ve ark 2002) **(Şekil 4)**.



Şekil 4. Şematize edilmiş *XRCC1* gen ürününün (turuncu) DNA zincir kırığı oluşan bölgede, PARP (sarı) ve DNA ligaz III (yeşil) molükülüyle yaptığı kompleks gösterilmektedir. http://asajj.roswellpark.org/huberman/DNA_Repair/dsbreak.html' den uyarlanmıştır.

XRCC1 399Gln alleli varlığı ile mutajenite göstergesi olan sister kromatid değişiminde artış olduğu ve bu nedenle de varyant Gln alleli ile DNA hasarları korelasyonunun olduğu bildirilmiştir (Lunn ve ark 1999, Duell ve ark 2000, Jennifer ve ark 2001). Buna ilave olarak *XRCC1 399Gln* varyant allelini taşıyan bireylerde diğer allele göre daha yüksek oranda DNA hasarının olduğu (Lunn ve ark 1999), iyonize radyasyona karşı hassasiyetin artığı (Hu ve ark 2001) ve sigara içiciliği ile ilişkili olarak DNA hasarlarının (Duell ve ark 2000, Abdel-Rahman ve ark 2000, Lei ve ark 2002) dah fazla görüldüğü rapor edilmiştir. *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminin baş-boyun ve akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sturgis ve ark 1999, Divine ve ark 2001) .

Larengeal skuamoz hücreli karsinom ile *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen kısıtlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmaların sonuçları arasında tutarsızlıklar mevcuttur. Varzim ve arkadaşları (2003) larengeal skuamoz hücreli karsinom ve *XRCC1 Arg399Gln* genotip dağılımının ilişkili olmadığını

bidirirken, Sturgis ve arkadaşları (1999) bu polimorfik yapının (*XRCC1 Arg399Gln)* tek başına bir ilişkisinin olmamasına rağmen *XRCC1 Arg194Trp* polimorfizmiyle kombine edildiğinde *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminin Gln alleli ile *XRCC1 Arg194Trp* polimorfizminin Arg allellerini beraber taşıyan bireyler için riskin artığını bildirmişlerdir. Buna karşılık Olshan ve arkadaşları (2002) ise varyan Gln allelinin LSHK'da koruyucu bir etkiye sahip olduğunu bildirmektedir.

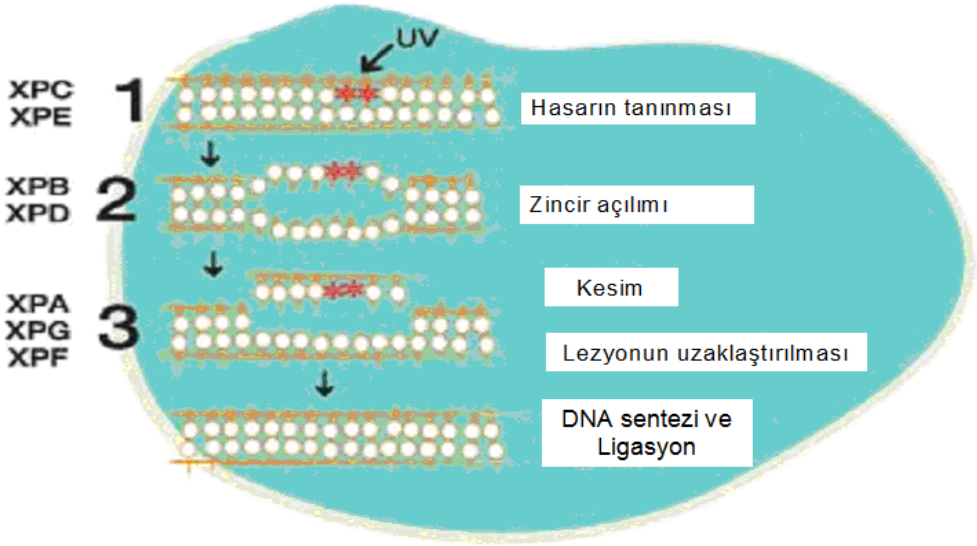
XRCC1 Arg399Gln polimorfizminin BER mekanizmasındaki önemli rolünden dolayı bir çok farklı popülasyonda değişik hastalık gruplarıyla çalışılmış olup **Tablo 1**'de bu çalışmalardan bazılarının ve bizim çalışmamızın kontrol gruplarının genotipik dağılımları ile allel frekansları görülmektedir.

Tablo 1. *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminin farklı toplumlardaki genotip ve allel frekansı dağılımı (Erdal ve ark 2004' den derlenerek alınmıştır).

POPULASYON	*XRCC1 (Arg399Gln)*			Allel frekansı		Referanslar
	Arg/Arg (%)	*Arg/Gln (%)*	*Gln/Gln (%)*	*Arg (%)*	*Gln (%)*	
Amerika (Beyaz)	38	49	13	62,5	37,5	Lunn ve ark 1999
Amerika (Siyah)	69	28	3	83	17	Lunn ve ark 1999
Tayvan	53	43	4	74,5	25,5	Lunn ve ark 1999
Amerika (Beyaz)	40	47	13	63,5	36,5	Stern ve ark 2001
Kafkas	48	40	12	68	32	Duell ve ark 2002
Afrika-Amerika	69	31	0	85	15	Duell ve ark 2002
Asya	57	33	10	74	26	Duell ve ark 2002
Italya	43,6	45,3	11,1	66	34	Matullo ve ark 2001
Çin	52,5	41,7	4,9	74,2	25,8	Chen ve ark 2002
Türkiye	37.3	56	6.7	65	35	Erdal ve ark 2004
Türkiye	**49.4**	**47.1**	**3.4**	**72.9**	**26.9**	**Mevcut çalışma**

2.2.2.1.2. NÜKLEOTİD EKSİZYON (NER) TAMİRİ

NER DNA tamir mekanizması 20–30 farklı proteinin görev aldığı kompleks bir DNA tamir mekanizması yoludur. Bu mekanizmanın ilk basamağı hasarın tanınması ile başlar, daha sonra hasarlı bölgedeki sarmalın açılması, sorunlu kısmın kesilerek çıkartılması, yeni zincirin sentezi ve ligasyon basamaklarıyla devam eder (de Boer ve ark 2000). Özetle NER ardı ardına işleyen kesme, uzaklaştırma ve yapıştırma basamaklarını içeren bir tamir mekanizması olarak tanımlanmaktadır (Bohr 1995) **(Şekil 5).**



Şekil 5. Şematize edilmiş NER mekanizması (www.igr.fr/eng/genetic-instability-2.shtml' den uyarlanarak alınmıştır).

Bu tamir mekanizmasında genel genom tamiri (GGT) ve transkripsiyona bağlı tamir (TBT) olmak üzere iki farklı yol vardır. Bu iki yol DNA hasarının tanınma basamağı haricinde birbirine benzemektedir. TBT yolu ile transkripsiyon esnasındaki hasarlar tamir edilir ve GGT yolundan daha hızlı işlemektedir (Hoeijmakers 2001, Stary ve Sarasin 2002).

Eksizyon tamir mekanizmasının moleküler temelini anlamak amacıyla NER hasarı olan iki mutant hücre kullanılmıştır. Bu hücreler, in-vitro şartlarda oluşturulan UV'ye duyarlı hamster hücreleri ve doğal hasarlı bireylerin (XP (Xeroderma pigmentosum), CS (Cockayne Sendromu) ve TTD (Trikotiyodistrofi)) hücre kültürleridir. Bu çalışmalarda XP'de XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF ve XPG olmak üzere 7; CS'de iki (CSA ve CSB), TTD'de ise üç (XPB, XPD ve TTDA) farklı gen tanımlanmıştır. Bunlar haricinde, mutant hamster hücreleri arasında da bazı genler tanımlanmış ve mutant hamster hücrelerinin insan DNA'sına transferi ile hamster hücrelerinin mutant fenotipi düzeltilmiş ve ERCC (Excision Repair Cross Complementing) genleri bulunmuştur. Bu çalışmalar, ERCC2'nin XPD, ERCC3'ün XPB, ERCC5'in XPG ve ERCC6'nın CSB genleri ile benzer olduğunu ortaya koymuştur (Bootsma ve ark 1995 ve Müftüoğlu 2003'den derlenmiştir). NER mekanizmasında görev alan bazı genler, homologları, fonksiyonları ve insan kromozomlarındaki lokalizasyonları **Tablo 2**'de gösterilmiştir**.**

Tablo 2. NER mekanizmasında yer alan genler, kromozomal lokalizasyonları ve özet fonksiyonları.

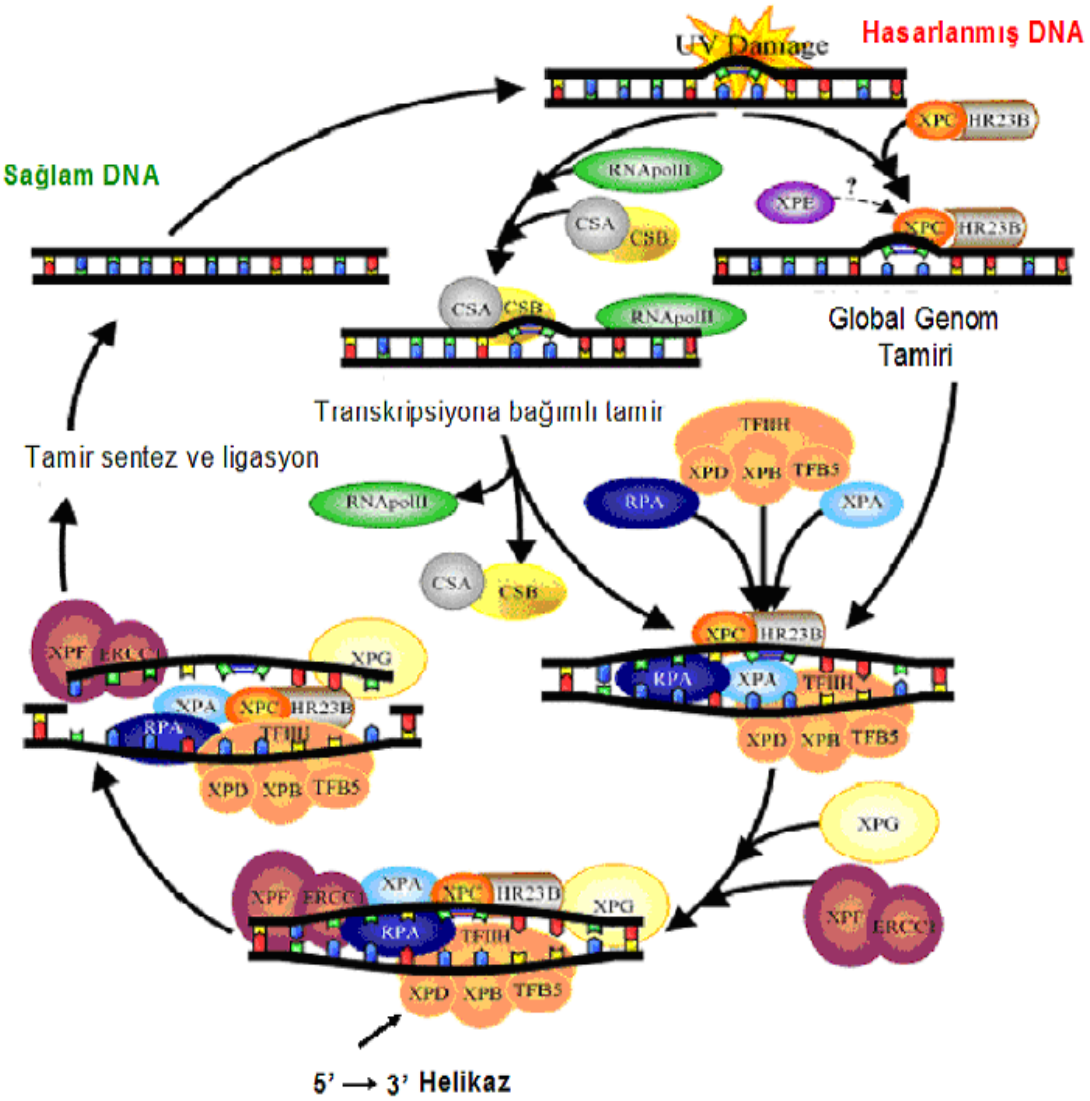
(http://www.cgal.icnet.uk/DNA_Repair_Genes.html#NER 'den alınmıştır).

GEN	FONKSİYON	LOKALİZASYON
ERCC1	5' kesim alt ünitesi	19q13.32
ERCC2 (XPD)	5' → 3' DNA helikaz aktivitesi	19q13.32
ERCC3 (XPB)	3' → 5' DNA helikaz aktivitesi	2q14.3
ERCC4 (XPF)	5' kesim altünitesi	16p13.12
ERCC5 (XPG)	3' kesim	13q33.1
ERCC6 (CSB)	Transkripsiyona bağlı tamirde hasar tanıma	10q11.23
XPA	Hasarlı bölgeye bağlanma	9q22.33
XPC	GGT yolunda hasarlı DNA'nın tanınması	3p25.1
LIG1	DNA ligasyonu	19q13.32

2.2.2.1.2 NER MEKANİZMASI

Transkribe olmayan DNA zincirindeki DNA hataları XPC/hHR23B (Xeroderma pigmentosum protein group C-human homolog of RAD23B) kompleksi ile tanınır (Sugasawa ve ark 1998, Volker ve ark 2001). XPC/hHR23B kompleksinin hasara bağlanması yapının açılmasına ve Transkripsiyon faktörü II H (TFIIH), XPA ve replikasyon proteini A (RPA) gibi diğer görevli proteinlerin bu bölgeye toplanmasına sebep olmaktadır (Weeda ve ark 1990, He ve ark 1995, Park ve ark 1995). Transkripsiyonda ve DNA tamirinde görev alan TFIIH çeşitli alt birimlerden oluşmaktadır. Bu alt birimlerden XPB 3′→5′ ve XPD 5′→3′ helikaz aktivitelerine sahiptir (Schaeffer ve ark 1994). Bu aktiviteler sayesinde, TFIIH DNA zincirinin hasarlı bölgesinin açılmasını sağlar (Evans ve ark 1997, de Boer ve Hoeijmakers 2000). Sonraki adımda, hasarlı zincir üzerinde kesim olayı gerçekleşir; XPG proteini hasarlı bölgenin 3′- bölgesinden (O'Donovan ve ark 1994), XPF/ERCC1 ise hasarlı bölgenin 5′- bölgesinde lezyonu keser (Sijbers ve ark 1996). İki tarafından kesilerek DNA zincirinden çıkartılan bu oligonükleotid, XPC/hHR23B proteini tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Geride kalan boşluk, DNA polimerazlar (δ ve ε) ile uygun şekilde kapatılır (Adayabalam ve ark 1992, Shivji ve ark 1992). Bu sentez aşamasından sonra, *DNA ligaz I* enzimi ile ligasyon yapılarak DNA zincirindeki hasarın tamiri tamamlanmış olur (Shivji ve ark 1995, Bohr VA 1995, Romina ve ark 1998, de Boer ve Hoeijmakers 2000) **(Şekil 6)**.

Hasarlı DNA'nın transkribe olan zinciri transkribe olmayan zinciriden daha hızlı bir şekilde NER yoluyla tamir edilir. Hücrede transkripsiyon esnasında DNA hasarı olan bölgeyle karşılaşan CSB proteini, RNA polimeraz III'ün yapısını bozarak RNA sentezini durdurur ve TBT yolunun aktive olmasını sağlar (Bohr ark 1985). Bu olay GGT yolundaki gibi TFIIH, XPA ve RPA (replikasyon proteini A) proteinlerinin sorunlu bölgeye göçüne neden olur ve gerikalan basamaklar GGT yolundaki gibi devam ederek hasarlı DNA zinciri tamir edilir (Batty ve Wood 2000, de Boer ve Hoeijmakers 2001, Müftüoğlu 2003) (**Şekil 6**).



Şekil 6. Şematize edilmiş NER tamir yolunun genel mekanizması ve XPD gen ürününün oluşturduğu protein kompleksi. (http://ccr.coriell.org/nigms/pathways/NER_main.gif' den uyarlanmıştır).

2.2.2.1.2.1. NER MEKANİZMASINDA *XPD* GENİ ve *Lys751Gln* POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİ

Weber ve ark (1998) tarafından UV-duyarlı CHO (Chines Hamster Overy) mutant hücrelerde, insan *ERCC2* (Excision Repair Cross-Complementing 2) geni tespit edilerek klonlandı. Bu genin fonksiyonunu ortaya koymaya yönelik yapılan çalışmada *ERCC2* genini içeren cosmid klonu UV hassasiyeti olan *XPD* hücrelerine transfer edildiğinde bu hücrelerde düzelme görüldüğü tesbit edilmiştir (Flejter ve ark 1992). Bu bulgu sonucunda, bu iki genin homolog olduğu ortaya konmuştu (Flejter ve ark 1992). İnsanlarda kromozom 19q13.2–13.3 bölgesine lokalize olan (Mohrenweiser ve ark 1989), *XPD* geni TFIIH'ın complementi olan bir helikaz enzimini kodlamaktadır (Sung ve ark 1993, Drapkin ve ark 1994). Bu enzim 5′→3′ DNA helikaz aktivitesine sahiptir ve bu sebeple transkripsiyon ve NER mekanizması tamir yolunda DNA çift zincirinin açılması işlemine katıldığı düşünülmektedir (Sung ve ark 1993).

XPD geninde de tek nükleotid seviyesinde farklı polimorfik yapıların olduğu bilinmektedir. Shen ve ark tarafından (1998) *XPD* geninin 23. ekzonunda *XPD Lys751Gln (35931 A→C)* polimorfizmi tanımlanmış ve bu polimorfizm sebebiyle kodlanan helikazın önemli bir bölgesindeki amino asid yapısının değişime uğradığı anlaşılmıştır (Benhamou ve Sarasin 2002, Matullo ve ark 2006).

XPD -751 Gln varyant allelini taşıyan sigara içen bireylerde DNA hasar seviyesinde artış (Matullo ve ark 2001, Tang ve ark 2002) ve DNA tamir kapasitesinin azalmasına sebep olduğu (Lehmann 2001, Goode ve ark 2002, Smith ve ark 2003, Shi ve ark 2004) rapor edilmiştir. Buna karşılık Lunn ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada ise Lys allelinin DNA hasarı artışıyla ilişkilendirildiği görülmektedir. Literatürde sigara ile ilişkili olduğu bilinen akciğer, göğüs ve skuamoz hücreli baş boyun kanserlerinde bu polimorfik yapının (*XPD -751 Gln)* kanser gelişimiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Sturgis ve ark 2000, Hu ve ark 2004, Terry ve ark 2004). Literatürde, LSHK ile *XPD Lys751Gln (A35931C)* polimorfizmi arasındaki ilşkiyi inceleyen sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada ise kanser gelişiminin Lys genotipinin varlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gajecka ve ark 2005). Bununla birlikte, farklı populasyonlarda sağlıklı bireylerde yapılan *XPD Lys751Gln* genotipleri ve allel dağılımı çalışmaları yapılmış olup bu çalışmalarda genotip ve allel dağılımının toplumlar arasında farklılık gösterdiği görülmüştür (Benhamou ve Sarasin 2005) (**Tablo 3**). Bu bulgu sonucunda *XPD Lys751Gln* genotip ve allel dağılımının populasyondan populasyona farklılık

gösterdiği görülmektedir. Bu nedenle, toplumdan topluma değişiklik gösteren her gen için her toplum kendi hasta grubunda ve sağlıklı bireylerde genotip ve allel dağılımını ortaya koyması gerekmektedir.

Tablo 3. Farklı popülasyonlarda *XPD Lys751Gln* polimorfizminin genotipik dağılımları ve allel frekansları (Benhamou ve Sarasin 2005' den alınmıştır).

POPULASYON	*XPD Lys751Gln*			Allel frekansı		Referanslar
	Lys/Lys (%)	*Lys/Gln (%)*	*Gln/Gln (%)*	*Lys (%)*	*Gln (%)*	
Çin	37.6	44	18.4	60	40	Chen ve ark 2002
Çin	83.1	16.3	0.6	91	9	Liang ve ark 2003
Güney Kore	89	11	0	84	6	Park ve ark 2002
Japon	90.4	8.8	0.8	95	5	Hamajima ve ark 1999
Finlandiya	34.1	50.7	15.2	59	41	Mistra ve ark 2001
İtalya	37.4	45.8	16.8	60	40	Shen ve ark 2003
İsviçre	42.6	40.1	17.3	63	37	Hou ve ark 2002
İngiltere	34	51	15	60	40	Winsey ve ark 2000
A.B.D (Afrika-Amerikan)	55.6	38.9	5.6	75	25	David ve ark 2001
A.B.D (Beyaz)	44.2	45	10.8	67	33	Spitz ve ark 2001
A.B.D (İspanik olmayan)	45.1	37.3	17.7	44	36	Qiao ve ark 2002
Türkiye	**42.5**	**57.5**	**0**	**71.3**	**28.7**	**Mevcut çalışma**

3. MATERYAL ve METOT

3.1. HASTA SEÇİMİ VE KONTROL GRUBU

Çalışmaya larengeal skuamoz hücreli karsinom (LSHK) tanısı alan 93 hasta dahil edildi. Kontrol grubunda kendi ve aile hikayesinde kanser olmayan 87 sağlıklı bireyin periferik kan örnekleri kullanıldı. Larinks hastalarının tamamı erkek olup olguların yaşları 38–78 arasında değişmektedir (yaş ortalaması 59). Hasta grubunda klinik muayene ve operasyon sonucuna göre TNM sınıflandırması yapıldı. Hastalar içerisinde "primer tümör (T)" ve "nodüler metastaz (N)" sınıflandırması yapıldı ancak hastaların hiçbirinde "uzak metastaz (M)" bulunmadığından istatistiksel analizlerde bu parametre kullanılmadı.

Bireylerin sigara kullanımı günde içilen sigara adedi olarak belirlendi ve ortalama değere göre iki sınıfa ayrıldı. Tümörün lokalizasyonu; glottik ve supralottik, tipi; T1, T2, T3 ve T4 ve nodüler metastazı; N0, N1, N2, N3 olarak belirlendi. DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon enzim kesimi çalışmaları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi araştırma laboratuarında yapıldı.

3.2. DNA İZOLASYONU

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan 2 ml'lik periferik kan örneği EDTA'lı tüplere steril olarak alındı. Yoğun tuz konsantrasyonu metodu kullanılarak total DNA izole edildi. DNA izolasyonu problemli olan hastalarıdan ise ticari kit (Qiagen, ABD) kullanılrak DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Bu işlemde;

- Falkon tüplerinin içerisine 10 ml soğuk steril distile su konuldu.

- Bunun üzerine EDTA'lı tüp içerisindeki periferik kandan 1 ml eklendi ve pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışması sağlandı.

- 4500 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.

- Oluşan süpernatan kısmı dökülerek, pelletin falkon tüpün dip kısmında kalması sağlandı.

- Pellet'in üzerine 850 µl nüclearliziz tamponu eklendi ve pipetaj yapılarak pelletin homojen hale gelmesi sağlandı.

- 37ºC'de 10 dakika bekletildi ve tekrar pipetaj yapıldı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi.

- Homojen hale gelmiş olan materyalin üzerine 850 µl kloroform eklendi ve vorteks ile karıştırılıp 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.

- 13000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi ve faz oluşumu sağlandı.

- Üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir ependorf içerisindeki 1 ml %96'lık alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde gözle görüldü.

- 12000 RPM'de 4 dakika santrifüj edilip alkol (etil alkol) ile DNA ependorf tüpün dibine çöktürüldü.

- Üzerine 200–500 µl %70'lik alkol eklenip 12000 RPM'de 3 dakika santrifüj edildi.

- %70'lik alkol dökülüp tüpün dibinde pellet şeklindeki DNA'nın kuruması için ependorf tüp ters çevrilip havada kurumaya bırakıldı.

- Havada kurutulan DNA steril distile su (150–300 µl) ile homojen hale getirildi.

- DNA, PZR analizinde kullanılmak üzere -20ºC'de bekletildi.

3.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

Genlerdeki hedef polimorfizimlerin otaya konması için restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RFUP-RFLP) tekniği kullanıldı. *DNA XPD Lys751Gln* gen polimorfizmlerinin değerlendirilmesinde A-C baz değişimi analizi için; 5'-CCT CTG TTC TCT GCA GGA GGA–3' ve 5'-CCT GCG ATT AAA GGC TGT GGA -3' primerleri kullanılarak 235bç uzunluğundaki PZR ürünü elde edildi. *XRCC1 Arg399Gln* gen polimorfizminde G→C baz değişimi için 5'- TTG TGC TTT CTC TGT GTC CA–3' ve 5'-TCC TCC AGC CTT TTC TGA TA–3' primerleri kullanılarak 615 bç lik hedef PZR ürünü elde edildi. Bunun için PZR reaksiyonu 20 µl'de gerçekleştirildi. Reaksiyon içeriği;

— 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)

— 2 µl 10xPZR tamponu

— 1 µl $MgCl_2$ (25 mM)

— 1,2 µl 10 pmol primer mix.

— 11,8 µl dH_2O

— 0,2 µl DNA Taq polimeraz enzimi

— 2 µl genomik DNA, karışım ile gerçekleştirildi.

PZR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PZR System 2700 model PZR cihazında;

— 94ºC'de 3 dakika bir döngü

— 94ºC'de 0,15 dakika,
— 60º de 0,15 dakika, } 10 döngü
— 72ºC'de 0,15 dakika,

— 94ºC'de 0,15 dakika,
— 57ºC'de 0,15 dakika, } 25 döngü
— 72ºC'de 0,15 dakika,

— 72ºC'de 3 dakika ve

— 4ºC'de bir döngü

PZR programı uygulanarak gerçekleştirildi. Her iki genin polimorfik bölgelerinin çoğaltımında kullanılan primerlerin Tm ısısı birbirine yakın olduğundan aynı PZR protokolü uygulandı.

3.4. JEL ELEKTROFOREZİ

Elde edilen PZR ürününü değerlendirmek için %2'lük agaroz (A 5093, Sigma) klasik TAE (Tris, Asetik asit ve EDTA) veya TBE (Tris, Borik asid ve EDTA) tamponu kullanıldı. Agaroz TAE içinde eritildikten sonra EtBr (10µg/ml Ethidium bromür) ilave edilerek boyandı. Elde edilen PZR ürününden 5 µl alınıp yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Ayrıca gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100bç'lik ladder kullanıldı. Jel UV illüminator altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda *XPD* geninde 235bç ve *XRCC1* geninde 615bç büyüklüğünde bantlar görüldü.

3.5. RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ VE GENOTİPLEME

Değerlendirme sonucunda geriye kalan 15 µl PZR ürünlerinde restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi analizi için restriksiyon kesimi yapıldı. Restriksiyon enzim kesimi için 6 µl'lik restriksiyon enzim kesim karışımları oluşturuldu. Bunun için 6 µl'lik karışım içinde;

— 3,5 µl steril dH_2O

— 2 µl Restriksiyon Enzim tamponu (x10)

— 0,5 µl (10 unit/ul) Restriksiyon Enzimi (*XPD Lys751Gln* geni için *PstI*, *XRCC1 Arg399Gln* geni içn *MspI*) içeren karışım ile gerçekleştrildi. 6 µl'lik karışımlar PZR ürününün içerisine eklendi ve su banyosunda 37 ºC'de 12–16 saat bekletildi. İşlem sonrasında tekrar %2'lik agaroz jel hazırlandı. Elde edilen enzim kesimi ürünleri jele yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu ve gözlenen bantların beklenen bantlar olup olmadığını tespit etmek için 100 bç'lık ladder (marker) kullanıldı. UV illüminator altında değerlendirilip fotoğrafı çekildi.

Diğer *XRCC1* gen için ise *Arg399Gln* bölgesinin genotiplendirmesi yapıldı ve RFUP sonucunda 615, 376 ve 239bç büyüklüğünde bantlar elde edildi. Yalnızca 615 bç'lık band AA (Gln/Gln) homozigot olarak; 615, 376 ve 239bç lık bantlar GA (Arg/Gln) (heterozigot) genotipi; ve 376, 239 bç büyüklüğündeki bantlar GG (Arg/Arg) (homozigot) genotipleri olarak değerlendirildi **(Şekil 7-A)**.

Değerlendirme sonucunda, *XPD Lys751Gln* geni için 235, 171 ve 64bç büyüklüğünde bantlar gözlendi. Genotipleme yapılırken sadece 235 bç büyüklüğünde bant görüldüğünde AA (Lys/Lys) homozigot; 235, 171 ve 64bç büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde AC (Lys/Gln) heterozigot; 171 ve 64bç büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde ise CC (Gln/Gln) homozigot şeklinde genotiplendirmesi değerlendirildi **(Şekil 7-B)**.

3.6 İSTATİSTİK ANALİZLER

Verilerin istatistik analizi SPSS for Windows 10,0 programı yardımıyla yapıldı, veriler ortalama ± standart sapma ve % olarak özetlendi. Kategorik veriler Chi-square testiyle değerlendirildi ve gruplar arasındaki ilişki Odds Ratio (OR) ve güven aralığı (%95) değerleri göz önüne alınarak kıyaslandı. Anlamlılık seviyesi 0.05 alındı.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya 93 LSHK'lı hasta ve 87 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 180 birey dahil edildi. *XRCC1 Arg399Gln* ile *XPD Lys751Gln* gen polimorfizimleri ile larengeal skuamoz hücreli karsinom arasındaki ilişki incelendi. Yapılan deneysel çalışma sonucunda **Şekil 7**'de görüldüğü gibi her iki genin polimorfik bölgeleri için yapılan geneotipleme agaroz jel kullanılarak belirlendi ve sonuçlar gruplandırılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

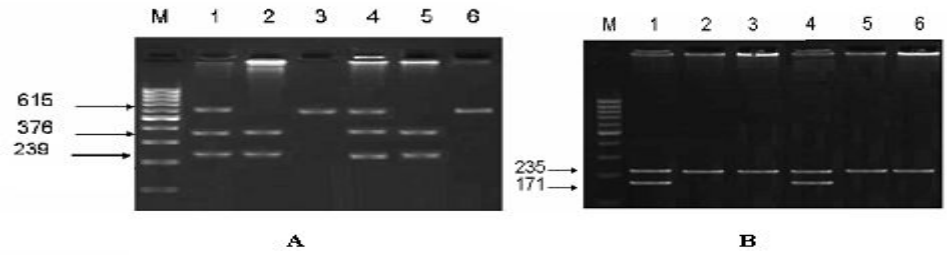
XRCC1 Arg399Gln bölgesinde hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerde (180 kişi) yapılan genotiplemede; 66 (%36,7) kişide Arg/Arg genotipi, 101 (%56,1) kişide Arg/Gln genotipi, 13 (%7,2) kişide Gln/Gln genotipi vardı. Hasta ve kontrol gruplarında Arg/Arg genotipi (sırası ile, %27,4 – %49,4), Arg/Gln genotipi (sırası ile, %64,5 - %47,1) ve Gln/Gln genotipi (sırası ile %10,8- %3,4) olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi **(Tablo 4-A)** (x^2= 13.21 p=0.001). Bu farklılığın sebebinin ortaya konması için **Tablo 5**'deki veriler kullanıldığında; Arg/Gln genotipinin kontrol grubunda 41 (% 47,1) kişide, hasta grubunda ise 60 (% 64,5) kişide mevcut olduğu görülmektedir. Arg/Gln genotipinin larengeal skuamoz hücreli karsinomlu bireylerde 2.7 kat artmış olduğu tespit edildi (x^2= 9,6 p=0.002; OR=2,7 , %95 GA: 1,4 – 5,2).

Gln/Gln genotopi kontrol grubunda sadece 3 (%3,4) kişide mevcuttu. İstatistiksel olarak beklenen değerin 5'den az olması sebebiyle Gln/Gln genotipinin hasta ve kontrol grubu arasındaki risk ilişkisi değerlendirilemedi. Bu sebeple Arg/Arg genotipi ile Arg/Gln ve Gln/Gln genotiplerinin toplamı (Arg/Gln +Gln/Gln) ele alındığında, kontrol grubunda Arg/Arg genotipinin, heterozigot ve homozigot varyan Gln allelini taşıyan toplam bireylere oranla 2.9 kat daha fazla görüldüğü **(Tablo 4-B)** ve bu oranda hastalıktan koruyucu etkisi olduğu anlaşıldı (x^2= 12,80 p=0.001; OR=2,9 , %95 GA: 1,5 – 5,5).

XRCC1 Arg399Gln polimorfik bölgesinde Arg allel frekansı kontrol ve hasta grubunda (sırası ile, %72,9 - %56,9), Gln allel frekansı (sırası ile, %26,9 - %43) olarak bulundu. İstatistiksel olarak allel frekansları arasında fark vardı (x^2= 6,1 p=0.001) **(Tablo 4-A)**. Varyan allel olan Gln allelinin hasta grubunda kontrol grubuna oranla 2,1 kat daha fazla olduğu görüldü ve LSHK için riskli allel olduğu sonucuna varıldı (x^2= 6,1 p=0.01; OR=2,1 , %95 GA: 1,1 – 3,8).

XPD Lys751Gln polimorfizmi için yapılan genotiplendirmede 78 (%43,3) kişide Lys/Lys genotipi, 102 (%56,7) kişide Lys/Gln genotipi bulundu. Gln/Gln genotipi her iki gruptada tespit edilmedi. Hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla Lys/Lys genotipi (% 44,1- % 42,5), Lys/Gln genotipi (%55,9 - % 57,5) ve Gln/Gln genotipi (%0-% 0) olarak bulundu. **Tablo 4-C'** de özetlenen bu genotipik oranların hasta ve kontrol grubu arasındaki dağılımları için istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (x^2= 0.04 p=0.83). Lys/Lys genotip referans alınarak yapılan istatistiksel hesaplamada heterezigot Lys/Gln genotipinin dağılımının hasta ve kontrol grubunda benzerlik gösterdiği, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu (x^2= 0.04 p=0.83; OR=0.9 , %95 GA: 0.5 – 1.6) (**Tablo 5**). Gln/Gln genotipinin her iki grupta olmamasından dolayı değerlendirme yapılamadı.

XPD Lys751Gln bölgesinin hasta - kontrol gruplarında *Lys* allel frekansı (sırası ile, %72,5 - %71,2), *Gln* allel frekansı (sırası ile, %27,9- %28,7) olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grupları açısından bu allel frekanslarının dağılımı bakımından istatistiki olarak fark tespit edilmedi (x^2= 0.02 p=0.87; OR=0.9 , %95 GA: 0.5 – 1.7).



Şekil 7. (**A**) *XRCC1* Arg399Gln bölgesinin PZR ürünün, *MspI* enzimi ile (**B**) **XPD** Lys751Gln bölgesinin *PstI* enzimi ile kesilmesinden sonra elde edilen jel fotografları.

(**A**) 2 ve 5. kuyucuklar (376 ve 239bç) Arg/Arg, 1. ve 4. kuyucuklar (615, 376 ve 239bç) Arg/Gln, 3 ve 6 kuyucuklar (615bç) Gln/Gln genotipini, M: DNA markerını (100 bç) göstermektedir.

(**B**) 2, 3, 5 ve 6 kuyucuklar (235bç) Lys/Lys ve 1 ve 4 kuyucuklar (235, 171 ve 64bç) Lys/Gln genopini göstermektedir. 64bçlik bant molekül ağırlığı küçük olduğundan görüntülenemedi.

Tablo 4: *XRCC1 (Arg399Gln)*, XPD *(Lys751Gln)* polimorfik bölgelerinin genotip dağılımları açısından hasta ve kontrol grubunun karşılaştırılması.

(A)	***XRCC1 (Arg399Gln)*** genotipleri			***XRCC1*** Allel frekansı	
	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Arg	Gln
Hasta : n (%)	23 (24,7)	60 (64,5)	10 (10,8)	(56.9)	(43.0)
Kontrol : n (%)	43 (49,4)	41 (47,1)	3 (3,4)	(72.9)	(26.9)
	$x^2 = 13.21$	P = 0.001		$x^2 = 6.1$	P = 0.01

(B)	***XRCC1 (Arg399Gln)*** genotipleri	
	Arg/Arg	Arg/Gln+ Gln/Gln
Hasta : n (%)	23 (%24,7)	70 (75,2)
Kontrol: n (%)	43 (%49,4)	44 (% 50,5)
	$x^2 = 12,80$ P = 0.01 OR (95% Cl) = 2.97 (1.58-5.59)	

(C)	*XPD (Lys751Gln)* genotipleri			*XPD* Allel frekansı	
	Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	Lys	Gln
Hasta n (%)	41 (44,1)	52 (55,9)	0	(72.5)	(27.9)
Kontrol n (%)	37 (42,5)	50 (57,5)	0	(71.2)	(28.7)
	$x^2 = 0.04$	P =0.833		$x^2 = 0.02$	P = 0.87

Tablo 5: Hasta ve kontrol grublarında *XRCC1 (Arg399Gln)* ve XPD *(Lys751Gln)* polimorfik bölgelerin allel dağılımı.

	KONTROL		HASTA					
	n	**(%)**	**n**	**(%)**	**x²**	**P**	**OR**	**%95 Güvenaralığı**
XRCC1 (Arg399Gln)								
Arg/Arg	43	(49.4)	23	(24.7)	Referans		1.0	Wild
Arg/Gln	41	(47.1)	60	(64.5)	9.6	0.002	2.7	(1.4 – 5,2)
Gln/Gln	3	(3.4)	10	(10.8)	-	-	-	-
Arg allel frekansı		(72.9)		(56.9)	Referans		1.0	
Gln allel frekansı		(26.9)		(43.0)	6.1	0.01	2.1	(1.1 – 3,8)
XPD (Lys751Gln)								
Lys/Lys	37	(42.5)	41	(44.1)	Referans		1.0	Wild
Lys/Gln	50	(57.5)	52	(55.9)	0.04	0.83	0.9	(0.5 – 1,6)
Gln/Gln	0	(0 8	0	(0)	-	-	-	-
Lys allel frekansı		(71.2)		(72.5)	Referans		1.0	
Gln allel frekansı		(28.7)		(27.9)	0.02	0.87	0.9	(0.5 – 1,7)
Birleştirilmiş genotipler								
XRCC1 + XPD								
Arg/Arg + Lys/Lys	17	(19.5)	10	(10.7)	Referans	1.0		
Arg/Arg + Lys/Gln	23	(26.4)	12	(12.9)	0.05	0.82	0.8	(0.3 – 2,5)
Arg/Gln + Lys/Lys	16	(18.3)	25	(26.8)	3.7	0.05	2.6	(0.9 – 7,2)
Arg/Gln + Lys/Gln	23	(26.4)	35	(37.6)	4.0	0.04	2.5	(1.0 – 6,6)
Gln/Gln + Lys/Lys	2	(2.2)	5	(5.3)	-	-	-	-
Gln/Gln + Lys/Gln	1	(1.1)	5	(5.3)	-	-	-	-

.

4.1. BİRLEŞTİRİLMİŞ GENOTİPLER İLE GRUPLAR ARASINDAKİ İLİŞKİ

XRCC1 Arg399Gln ve *XPD Lys751Gln* polimorfik bölgelerinin genotipik yapılarının aynı bireyde bir araya gelme ihtimali yani sinerjetik etkileri göz önüne alınarak, birleştirilmiş genotip analizi apıldı (**Tablo 5**). Bir bireyde *XRCC1* geninde Arg/Arg, *XPD* geninde Lys/Lys genotiplerinin bulunması durumu istatistiksel olarak değerlendirildi ve Arg/Arg + Lys/Gln genotiplerinin beraber olması bakımından iki grup arasında fark gözlenmedi (x^2= 0,05 p=0.82; OR=0,8 , %95 GA: 0,3 – 2,5). Ancak hasta ve kontrol grupların'da (Arg/Gln) + (Lys/Lys) genotiplerinin dağılımı istatistiksel olarak sınırda bir değerde anlamlılık tespit edildi (x^2= 3,7 p=0.05; OR=2,6 , %95 GA: 0,9 – 7,2). Her iki grupta Arg/Gln + Lys/Gln genotip kombinasyonunu bulunduran bireyler arsında bir fark mevcut olmasına rağmen sınıra yakın bir değer gözlendi (x^2= 4 p=0.04; OR=2,5 , %95 GA: 1,0 – 6,6). Bireylerde Gln/Gln + Lys/Lys veya Gln/Gln + Lys/Gln genotiplerinin bir arada bulunması durumundaki veriler, istatistiksel analiz için küçük değerlerde olduğunda, gruplar arasındaki ilişkinin ortaya konması için inceleme yapılamadı (**Tablo 5**).

4.2. YAŞ İLE GENOTİPLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Çalışmaya dahil edilen bireylerin tamamı erkek olup ortalama yaşı 59.2± 7.73 (38–78 yaş) (ortalama yaş: 59) idi. Yaş grupları oluşturulurken 59 ve altı (≤59), 60 ve üzeri (>60) olmak üzere iki grup oluşturuldu (Ekler kısmında'ki **Tablo 6**'ya bakınız).

Yaş bakımından incelendiğinde, hasta grubundaki bireylerden 43 (% 46.23) kişi 59 ve altı, 50 (%53.76) kişi 60 ve üzeriydi. *XPD Lys751Gln* ve *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizimlerinde yaş grupları açısından istatistiksel bir fark olmadığı görüldü (sırası ile ; x^2=0.16, p=0.68 - x^2=0.18, p=0.91).

XRCC1 Arg399Gln bölgesinin Arg/Arg genotipi taşıyan bireylerin, Arg/Gln ve Gln/Gln genotiplerini taşıyan toplam bireylerle yaş grupları açısından aralarında bir fark tespit edilmedi (x^2= 0.03, p=0.86; OR=1.08, %95 GA: 0.42–2.79) . *XPD Lys751Gln* polimorfik bölgesinde Gln/Gln genotipinin her iki grupta bulunmamasından dolayı, *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmindeki gibi istatistiksel değerlendirme için genotipik dağılım incelenmedi (**Tablo 6**). *XPD Lys751Gln* ve *XRCC1 Arg399Gln* polimorfik yapılarının wild tip allelleri olan Arg/Arg ve Lys/Lys genotiplerini beraber taşıyan bireylerin diğer genotipleri taşıyan toplam bireylerle yaşgrupları açısından fark gözlenmedi (x^2= 0.003, p=0.95; OR=0.96, %95 GA: 0.27–3.41).

4.3. SİGARA ALIŞKANLIĞI İLE GENOTİPLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Bireylerin sigara kullanımı günde içilen sigara adedi olarak belirlendi ve ortalama değere göre iki sınıfa ayrıldı. Elde edilen değerin 39 ve altı hafif, 40 ve üzeri ağır sigara içiciliği olarak iki grup oluşturuldu (**Tablo 6**). Bireylerden 36 (%37.70) kişi hafif, 57 (%61.29) kişi ağır sigara içicisiydi. *XPD Lys751Gln* ve *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizimlerinde sigara grupları açısından istatistiksel bir fark olmadığı tespit edildi (sırasıyla, x^2= 0.13, p=0.70 - x^2= 1.16, p=0.56). *XRCC1 Arg399Gln* bölgesinin Arg/Arg genotipi taşıyan bireylerin, Arg/Gln ve Gln/Gln genotiplerini taşıyan toplam bireylerle sigara grupları açısından aralarında bir fark olmadığı görüldü (x^2= 1.07, p=0.30; OR=1.65, %95 GA: 0.63–4,2) . *XPD Lys751Gln* ve *XRCC1 Arg399Gln* polimorfik yapılarının wild tip allelleri olan Arg/Arg ve Lys/Lys genotiplerini beraber taşıyan bireylerin diğer genotipleri taşıyan toplam bireylerle sigara grupları açısından da farklılıklarının olmadığı tespit edildi (x^2= 0.23, p=0.62; OR=1.37, %95 GA: 0.38–4.87).

4.4. TÜMÖR LOKALİZASYONU İLE GENOTİPLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Larinks bölgesinde tümör gelişim yerine göre, tümör lokolizasyonları 49 (%52,7) bireyde supraglottik, 44 (%47,3) bireyde glottik yerleşimli olduğu görüldü (**Tablo 6**).

XRCC1 Arg399Gln ve *XPD Lys751Gln* polimorfizimleriyle tümör lokalizasyonu arasında bir fark yoktu (sırası ile, x^2= 0.34, p=0.55; x^2= 0.52, p=0.77). *XRCC1 Arg399Gln* bölgesinin Arg/Arg genotipini taşıyan bireyleri ile Arg/Gln ve Gln/Gln genotiplerini taşıyan toplam bireylerin tümör lokalizasyonu açısından aralarında bir fark tespit edilmedi (x^2= 1.18, p=0.67; OR=0.81, %95 GA: 0.31–2.10). *XRCC1 Arg399Gln* ve *XPD Lys751Gln* polimorfik yapılarının Arg/Arg ve Lys/Lys genotiplerini beraber taşıyan bireylerin diğer genotipleri taşıyan toplam bireylerle tümör lokalizasyonları açısından da aralarında istatistiksel fark mevcut olmadığı görüldü (x^2= 0.01, p=0.89; OR=0.91, %95 GA: 0.26–3.25).

4.5. TNM SINIFLANDIRMASIYLA GENOTİPLER ARASINDAKİ İLİŞKİ

Tümör sınıflandırmasına göre hasta grubumuzda T1 de 15 (%16,1), T2 de 17 (%18,3), T3 de 48 (%51,6) ve T4 de 13 (%14) birey vardı. Bu hastaların boyun durumana göre 50 hasta (%53,8) N0, 21 hasta (%22,6) N1, 19 hastada (%20,4) N2 ve 3 hastada (%3,2) N3 olarak tümör sınıflandırılması yapıldı (**Tablo 6**).

XRCC1 Arg399Gln ve *XPD Lys751Gln* polimorfizimlerinin genotipik dağılımlarıyla; T1, T2, T3, T4 ve N0, N1, N2, N3 grupları arasında bir fark yoktu (sırası ile, x^2= 2.37, p=0.49, x^2= 3.8, p=0.70 - x^2= 5.56, p=0.13, x^2= 4,6, p=0.59). *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminde Arg/Arg genotipini taşıyan bireylerin, Arg/Gln ve Gln/Gln genotiplerini taşıyan toplam bireylerle T1, T2, T3, T4 ve N0, N1, N2, N3 grupları arasındaki dağılımları açısından farklılık mevcut değildi (x^2= 2.36, p=0.50 - x^2= 3, p=0.38, sırasıyla) . *XRCC1 Arg399Gln* ve *XPD Lys751Gln* polimorfik yapılarının Arg/Arg ve Lys/Lys genotiplerini beraber taşıyan bireylerin, diğer genotipleri taşıyan toplam bireylerle T1, T2, T3, T4 ve N0, N1, N2, N3 grupları açısından farklılıklarının olmadığı görüldü (x^2= 0.79, p=0.85).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Skuamöz hücreli karsinom üst solunum yollarında en çok görülen maling tümör olup, larinks kanserlerinin yaklaşık %95'ini oluşturur. Laringeal hücre karsinomlu hastaların büyük çoğunluğu 50 yaşın üzerinde olup, % 96 sı erkektir (Cann ve ark 1985, Engin ve Erişen 1993, Rosai 1996).

Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin patogenezinde rol oynayabilir. Özellikle moleküler düzeyde hücresel zarara sebep olan ajanların hücre döngüsü, hücre ölümü ve farklılaşması süreçlerindeki etkileri kanserleşme ile ilişkilidir. Larinks kanseri gelişimi ile ilgili olarak sigara ve alkol kullanımının en önemli çevresel risk faktörleri olduğu bilinmektedir (Dosemeci ve ark 1998, Jurkiewicz ve ark 2006). Sigaranın içerdiği birçok kimyasal madde özellikle karsinojen bileşikler ve serbest oksijen radikalleri DNA'nın yapısına zarar vermekte ve tek ya da çift DNA zincir kırıklarına sebep olmaktadırlar (Kiyosawa ve ark 1990, Halliwell ve Cross 1994, Yoshie ve Ohshima 1997, Kodama ve ark 1997, Jaloszyński ve ark 2003).

DNA hasarları çeşitli hasar tiplerine göre birçok farklı yollarla tamir edilir. DNA eksizyon tamir mekanizmasının iki farklı üyesi olan BER (Base exision repair) ve NER (Nucleotide exision repair) mekanizmaları DNA tek ve çift zincir kırıklarının tamirinde rol alan önemli yollardır. (Kubota ve ark 1996, de Boer ve Hoeijmakers 2000, Balajee ve Bohr 2000, Hoeijmakers 2001). *XRCC1* geni BER tamir mekanizmasının, *XPD* geni ise NER tamir mekanizmasının iyi bilinen birer üyesi olup, bu genlerde çeşitli tek nükleotid polimorfizimleri tespit edilmiştir (Lindahl ve ark 1997, Shen ve ark 1998, Matullo ve ark 2006). Bu polimorfizimlerden özellikle *XRCC1 Arg399Gln ve XPD Lys751Gln* polimorfizimlerinin DNA hasarlarının tamir edilebilme kapasitesini değiştirebilen önemli fonksiyonel değişiklikler olduğunu bildirilmektedir (Kubota ve ark 1996, Nash ve ark 1997, Mason ve ark 1998, Lehmann 2001, Goode ve ark 2002, Smith ve ark 2003, Shi ve ark 2004). Literatürde, LSHK ile *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen sınırlı sayıda (üç çalışma) mevcut iken *XPD Lys751Gln* polimorfizimi arasındaki ilişkiyi inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, etiyolojisinde DNA hasarlarına sebep olduğu çok iyi bilinen, sigara gibi önemli bir faktörün yer aldığı LSHK'lı bireyler ile sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu arasında, DNA hasarlarının tamirinde önemli fonksiyonları olan *XRCC1 Arg399Gln ve XPD Lys751Gln* gen polimorfizimlerinin

araştırılması ve genotipik dağılımlarıyla hasta yaşı, sigara kullanımı ve TNM sınıflandırılması arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığını ortaya koyma bakımından ayrı ayrı ve her iki polimorfizmin kombine sinerjitik etkileri araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmanın sonucunda elde edilen verilere göre *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmi bakımından LSHK'lı bireylerle kontrol grubuna dahil bireyler arasında anlamlı bir farkın olduğu, varyant allel olan Arg allelinin hasta grubunda kontrol grubuna oranla daha fazla sıklıkla görülmesine rağmen hasta sayısının azlığı nedeni ile riskli Gln allelinin riski artırma oranı hesaplanamadı. Bununla birlikte, heterozigot Arg/Gln genotipinin LSHK'lı bireylerde 2.7 kat daha fazla kanser gelişme riskini artırdığı gözlendi.

Allel frekansı bakımından hasta ve kontrol gruplarının allel frekansı dağılımı oldukça farklılık gösterdiği ve varyan Gln allelinin hasta bireylerde 2,1 kat daha fazla olduğu görüldü. Aynı zamanda Tablo 4-B'de görüldüğü gibi heterozigot Arg/Gln ve homozigot Gln/Gln allellerini taşıyan toplam bireylerin homozigot Arg allelini taşıyan bireylere oranla 2.9 kat daha fazla larengeal skuamoz hücreli karsinoma yakalanmaları, risk oranı hesaplanamayan Gln allelinin risk artırıcı etkisini açıkça ortaya koyduğu görülmektedir.

Literatürde larengeal skuamoz hücreli karsinom ile *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen araştırmalara bakıldığında ise Varzim ve arkadaşlarının çalışmalarının bizim sonucumuzla çeliştiği, Sturgis ve arkadaşlarının kısmı olarak desteklediği görülmektedir (Sturgis ve ark 1999, Varzim ve ark 2003). Bizim sonucumuz ile Olshan ve arkadaşlarının sonuçları arasındaki ilginç bir farklılık bulunmaktadır. Çalışmamızda riskli allel olarak gösterdiğimiz Gln alleli Olshan ve arkadaşlarının çalışmasında kontrol grubunda hasta grubuna oranla daha fazla görülmekte ve varyant Gln allelinin LSHK gelişme riskini azalttığından söz edilmektedir (Olshan ve ark 2002). Bu bulgu farklılığı allelerin populasyondan populasyona sıklıklarının değişikliğinden kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir. Jennifer ve arkadaşlarının (2001) bulguları da çalışmamızda riskli allel olarak gösterdiğimiz Gln allelinin DNA hasarlarının tamir edilebilme kapasitesinde azalmaya sebep olduğunu bildiren sonucumuzu desteklemektedir. Benzer şekilde literatürde çalışmamızı destekleyen bulgular rapor edilmiştir (Lunn ve ark 1999, Duell ve ark 2000, Abdel-Rahman ve ark 2000, Hu ve ark 2001, Lei ve ark 2002).

Çalışmamıza konu olan diğer gen olan *XPD Lys751Gln* polimorfizminin LSHK'lı bireylerde ve kontrol grubundaki dağılımının kanser gelişimiyle bir ilişkisinin olmadığı ortaya konmuştur. Ayrıca iki grup arasındaki allel frekanslarının çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Literatürde LSHK ile *Lys751Gln* polimorfizim arasındaki ilişkiyi inceleyen sadece bir yayın olup bu araştırmada kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiş ve Lys genotipinin 1,6 kat kanserleşme riskini artırdığı bildirilmiştir (Gajecka ve ark 2005). Yapılan bazı çalışmalarda DNA hasar seviyesindeki artış ile genelde Gln alleli ilişkilendirilirken (Matullo ve ark 2001, Lehmann 2001, Tang ve ark 2002, Goode ve ark 2002, Smith ve ark 2003, Shi ve ark 2004), Gajecka ve arkadaşları (2005) ve Lunn ve arkadaşları (2000) ise Lys allelinin riskli allel olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kanser gelişimi için risk faktörü sayılabilecek birçok genetik farklılığın tek başlarına bir patolojiyle ilişkilendirilememesine rağmen, aynı hedefe yönlenmiş bazı değişikliklerin bir arada bulunmasının sinerjitik etkisi nedeniyle bireysel olarak riski artırabileceğini gösteren çalışmalar rapor edilmiştir (Duell 2000, Sturgis 2002). Çalışmamızda *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizminin Arg/Gln genotipi ile *XPD Lys751Gln* polimorfizminin Lys/Lys genotipinin aynı bireyde bulunması LSHK gelişme riskini 2,6 kat, Lys/Gln genotipinin bulunmasında ise 2,5 kat artırtığını göstermesine rağmen, *XRCC1 Arg399Gln* yapısı tek başına ele alındığında kontrol ve hasta grupları arasındaki hesaplanan riskin 2,7 kattan daha az olması bu verinin sadece *XRCC1* genindeki Arg/Gln allelinin etkisiyle görüldüğü, aslında çalışmamıza konu olan iki polimorfik yapının genotipik kombinasyonlarının bir risk faktörü oluşturmadığını göstermektedir.

Larinks kanserlerinde prognozu belirleyen en önemli etken servikal lenf nodlarında metastaz olup olmamasıdır (Rosai 1996). Glottik bölgede lenfatik ağın az olmasından dolayı bu bölgedeki tümörlerin prognozu iyidir ve uzun bir süre metastaz yapmazlar. Bununla birlikte gecikmiş teşhis sebebiyle lokalizasyonunu korumayıp yayıldığı ve bu durumun, hastaların hayatta kalma oranlarının azalmasına sebep olduğu bildirilmektedir (Johnson ve Myers 1991). Supraglottik tümörler prognostik olarak daha agresif bir seyir izlerler ve klinik olarak pozitif metastaz oranı %35–45 arasındadır. Subglottik tümörlerin servikal lenf nodu metastazı ise %25'dir. Bu sebepten dolayı LSHK gelişme riski daha yüksek olan bireylerde bu patolojinin erken tanımlanabilmesi ve prognozu etkileyen faktörlerin önceden tahmin edilebilmesi hayati önem taşımaktadır. Çünki LSHK'da grade prognoz ile uyumlu bir ilişki göstermektedir (Friedmann ve Ferlito

1993, Engin ve Erişen 1993). Mevcut çalışmamızda, *XRCC1 Arg399Gln* polimorfizmi ve *XPD* (*Lys751Gln)* polimorfizmi ile ayrıca her iki polimorfizmin sinerjik etkisinin ortaya konması için; kombine edilmiş genotipik dağılım analizi yapıldığında, tümörün lokalizasyonu, metastaz oranı gibi prognozu etkileyen faktörler (TNM) arasında bir ilişki olmadığı anlaşıldı. Literatürde aynı polimorfik yapılarla LSHK arasındaki ilişkiyi inceleyen diğer yayınlarda TNM sınıflandırılması ile genotipik yapıların karşılaştırılmadıkları görülmektedir (Sturgis ve ark 1999, Olshan ve ark 2002, Varzim ve ark 2003). Ayrıca hasta grubumuz içerisinde ağır ve hafif sigara kullanımı ile yaş gruplarının genotipik açıdan kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda, grupların birbirine yakın dağılım gösterdiği ve istatistiksel bir farkın olmadığı tespit edildi.

Birçok kanser türünde olduğu gibi laringeal kanserlerde de erken tanı, hastanın yaşam şansı ve yaşam kalitesi açısından çok önemlidir. Laringel kanserlerin ortaya çıktığı anatomik bölgenin komşuluklarından (merkezi sinir sistemi, kraniyel sinirler) ve işlevsel yapısından (solunum, beslenme, konuşma) dolayı bu önem daha da artmaktadır. LSHK söz konusu olduğunda erken tanı ve tedavi çok daha büyük bir önem erzetmektedir. Çünkü bu kanser türünün yaklaşık % 90'nın ortaya çıkış nedeni bilinmekte ve önceden önlenebilme potansiyeli taşımaktadır (Engin ve Erişen 1993).

Mevcut çalışma sonucunda *XRCC1 Arg399Gln* tek nükleotid polimorfiziminde homozigot Gln/Gln ve heterozigot Arg/Gln genotipinin DNA tamir kapasitesinde azalmaya sebep olduğu tesbit edildi. LSHK'ın gelişme riskininin Arg/Gln genotipinde 2.7 kat arttığı anlaşıldı ve bu polimorfik yapının sigara içen bireylerde LSHK'nın ortaya çıkma riskini artırdığı, *XPD Lys751Gln* polimorfizminin ise LSHK gelişme riskiyle bir ilişkisinin olmadığı gözlendi. Ayrıca her iki polimorfik yapının kombine edilerek incelendiğinde ise herhangi bir etkileşiminin olmadığı anlaşıldı.

Polimorfik gen bölgelerindeki genotipik dağılımların sağlıklı topluluklarda toplumdan topluma farklılılar göstermesi nedeniyle, çalışmalar arasındaki uyumsuzluklarda bu faktör göz önüne alınmalı ve her toplum kendi genotipik dağılımlarını ortaya koymalıdır. LSHK'ın moleküler temelinin anlaşılması ve riskli bireylerin önceden belirlenebilmesi için DNA tamir mekanizmalarında önemli rolleri olan bu iki gendeki fonsiyonel polimorfik yapıların sayısal olarak daha büyük populasyonlarda çalışılması ve aynı hedefe yönlenmiş farklı polimorfik yapılarla sinerjitik etkilerini ortaya koyarak genetik faktörlerin belirlenmesi önem arz etmekte

6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi/ KONYA–2008
Ziyaeddin İNAN

Danışman
Prof. Dr. Hasan ACAR

Larinks Kanserli Hastalarda DNA Tamir Geni Polimorfizimnin PCR-RFLP Yöntemiyle Araştırılması

Bütün baş boyun kanserlerinin yaklaşık %90–95'i squamoz hücre karsinomları olup, üst solunum yollarını tıkayan en yaygın tümör tipi laringeal squamoz hücre karsinom (LSHK) larıdır. İnsidansı toplumsal farklılılar ve çeşitli çevresel faktörlerden dolayı değişiklikler göstermektedir. Birçok çalışmada DNA tamir genlerinin tamir kapasitelerinin azalmasıyla, bireylerde kanser gelişme hassasiyeti arasında önemli bir ilişki olduğunu bildirmektedir. DNA tamir gen ürünleri sürekli olarak çevresel ve hücresel kaynaklı kanserojene maruziyetinde meydana gelen DNA hasarlarının doğru şekilde tamir edilmesinde rol alırlar. Biz bu çalışmamızda *XRCC1* (X-ray repair cross-complementing 1) geninin Arg399Gln ve *XPD* (ERCC2) geninin Lys751Gln polimorfizimleri ile LSHK arasında genotipik dağılım, sigara alışkanlığı, yaş ve TNM sınıflandırılması arasındaki ilişkiyi inceledik. Çalışmamız sonucunda, *XPD Lys751Gln* polimorfizimi ile LSHK arasında genotipik dağılım, sigara kullanımı, yaş ve TNM sınıflandırılması arasında ilişkinin olmadığı anlaşıldı ($p>0.05$). Diğer taraftan *XRCC1* geni Arg399Gln polimorfizminin LSHK'lı hastalarla kontrol grubu arasında genotipik dağılım açısından önemli bir farklılık tespit edildi ($P<0.05$). Sonuç olarak çalışmamızda *XPD Lys751Gln* polimorfizmi ile LSHK gelişimi arasında bir ilişki olmadığı *XRCC1* geni Arg399Gln polimorfizimi ile anlamlı bir ilişkinin bulunduğu saptandı.

7. SUMMARY

Selcuk University
Health Science Institute
Department of Medical Genetics
Master thesis / KONYA 2008
Ziyaeddin İnan

Supervisor
Prof. Dr. Hasan ACAR

Evaluation of DNA Repair gene Polymorphism in Patiens with Larynx Cancer by PCR-RFLP Technique

Squamous cell carcinoma is the most common (90–95%) of all head and neck cancers (SCCHN), and laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) is one of the most common tumors of the upper aerodigestive tract. The incidence varies according to geographical area and most probably depends on specific environmental risk factors. Many studies reported that polymorphisms in DNA repair genes reduce their capacity to repair DNA damage and thereby lead to a greater susceptibility to cancer. DNA repair enzymes continuously monitor DNA to correct damaged nucleotide residues generated by exposure to environmental mutagenic and cytotoxic compounds or carcinogens. Our objective was to investigate the association, if any, between XRCC1 (X-ray repair cross-complementing 1) for Arg399Gln and XPD (ERCC2) for Lys751Gln polymorphic genotypes and LSHK, smoking habits, tumor-node-metastasis (TNM) classification, and patient age. There was no significant difference in the genotype distribution of XPD between LSCC patients and their smoking and alcohol habits, tumor-node-metastasis (TNM) classification, and patient age and controls for each polymorphism ($p>0.05$). However, there was a significant difference between the genotype distributions of XRCC1 in patients and in control groups ($P<0.05$). Our result concluded that polymorphism in *XRCC1* codon 399 was associated with risk of LCSS in a sample of the patients while polymorphism in *XPD* codon 751 was not.

8.LİTERATÜR LİSTESİ

Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA (2000) *The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK, Cancer Lett, 159,63–71.*

Acar H, Ozturk K, Muslumanoglu MH, Yıldırım MS, Cora T, Cilingir O, Ozer B (2006) *Relation of glutathione S-transferase genotypes (GSTM1 and GSTT1) to laryngeal squamous cell carcinoma risk, Cancer Genetics and Cytogenetics, 169, 89–93*

Adayabalam S, Balajee I, Irina D,Vilhelm AB (1999) *Oxidative damage-induced PCNA complex formation is efficient in xeroderma pigmentosum group A but reduced in Cockayne syndrome group B cells*, *Nucleic Acids Research, 10, 22–27.*

Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M, (2005) *Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: Towards an integrated clinicobiological approach European Journal of Cancer, 41, 683–69.*

Balajee AS, Bohr VA (2000) *Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair, Gene, 250, 15-30.*

Batty DP, Wood DW (2000) *Damage recognition in the nucleotide excision repair of DNA. Gene 241, 193–204.*

Becker W, Neumann HH, Pfaltz CR (1993) *KBB Hastalıkları El Kitabı (çeviri). Cevanşir B, çeviri editörü. İstanbul Universitesi Tıp Fakültesi Erişkin ve Çocuk KBB Hastalıkları, Baş-Boyun Cerrahisi ve Iletişim Bozuklukları Derneği Yayını, İstanbul 386–427.*

Benhamou S, Sarasin A (2005) *ERCC2/XPD Gene Polymorphisms and Lung Cancer: A HuGE Review, American Journal of Epıdemıology 161(1).*

Benhamou S, Sarasin A (2002) *ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. Mutagenesis; 17,463–469.*

Berwick M, Vineis P (2000) *Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an Epidemiyologic revie, Journal of the National Cancer Institute, 92(11).*

Biolchini F, Pollastri G, Figurelli S, Chiarini L (2005) Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review Minerva Stomatol.54(7–8):405–414.

Blot W, McLaughlin J, Winn D (1998) *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer, Cancer Res, 48, 3282–3287*

Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC (1985) *DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. Cell 40, 359–369.*

Bohr VA. (1995) *DNA repair fine structure and its relations to genomic instability, Carcinogenesis,16,2885–2892*.

Bootsma D , Weeda G , Vermeulen W , Van H V, Troelstra C , Spek P V.D , Hoeijmakers J (1995) *Nucleotide Excision Repair Syndromes: Molecular Basis and Clinical Symptoms Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 30;347(1319):75–81.*

Cann CI, Fried MF, Rothman K], (1985) *Epidemiology of squamous celI cancer of the head and neck. Otolaryngol Clin North Am, 18(3): 367–388. Carcinogenesis, 27(5), 997–1007.*

Chen S, Tang D, Xue K (2002) DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. Carcinogenesis;23(8):1321-1325.

Chen Y, Li G, Ym S (2002) *Individual susceptibility to hematotoxicity from benzene exposure and the genetic polymorphism of metabolic enzymes, Wei Sheng Yan Jiu, 3 1,130–132.*

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003) *Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease FASEB J,17, 1195–1214.*

de Boer J, Hoeijmakers J. (2000) *Nucleotide excision repair and human syndromes. Carcinogenesis, 21, 453–460.*

Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL, Belinsky SA (2001) *The XRCCI 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung, Mutat Res, 461, 271—278.*

Dosemeci M, Gokmen I, Unsal M, Hayes RB, Blair A (1997) *Tobacco, alcohol use, and risks of laryngeal and lung cancer by subsite and histologic type in Turkey Cancer Causes Control, 8(5):729-737.*

Drapkin R, Reardon JT, Ansari A, Huang JC, Zawel L, Ahn K, Sancar A, Reinberg D (994) *Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II Nature 368, 769 – 772.*

Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Wiencke JK, Kelsey KT (2002) A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in XRCC1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. Cancer Research;62(16):4630–4636.

Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT (2000) *Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells, Carcinogenesis, 21,965–97.*

Engin K, Erişen L (1993) *Baş-Boyun Kanserleri, İstanbul, Nobel tıp kitapları, 345–352.*

Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD (1997) *Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors, EMBO J, 16, 6559–6573.*

Flejter WL, McDaniel LD, Johns D, Friedberg EC, Schultz RA (1992) *Correction of xeroderma pigmentosum complementation group D mutant cell phenotypes by chromosome and gene transfer: involvement of the human ERCC2 DNA repair gene, Proc Natl Acad Sci USA, 89,261–265.*

Friedmann I, Ferlito A (1993) *Squamous cell carcinoma. In: Ferlito A editor. Neopiasms of larynx. New York: Churchill Livingstone, 113-133.*

Gajecka M, Jarmuzs M, Szyfter W, Szyfter K (2004) *Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal squamous cell carcinoma patients Oncol Rep. 12(1):153–157.*

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskuła-Sztul R, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K (2005) CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma Mutation Research, 574, 112–123.

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskuła-Sztul R, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K (2005) *Reduced DNA repair capacity in laryngeal cancer subjects. A comparison of phenotypic and genotypic results, Adv. Otorhinolaryngol. 62, 25–37.*

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) *Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk, Cancer Epidemiol Biomarkers Pre, 11(12), 1513–1530.*

Halliwell B, Aruoma OR (1991) *DNA damage by oxygen derived species. Its mechanisms of action and measurements in mammalian system, FEBS Lett, 281, 9-19.*

Halliwell B, Cross CE (1994) *Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stres, Environ Health Perspect, 10, 5–12.*

Hamzaoglu O, Ozcan U (2006) *Türkiye Sağlık İstatistiklari. Syf 61.*

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabiánová E, Rudnai P, Brennan P (2007) *Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe , 1;165(7):814–20.*

He Z, Henricksen LA, Wold MS, Ingles CJ (1995) *Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA, Nature, 374, 566–569.*

Hermsen M, Alonso Guervós M, Meijer G, van Diest P, Suárez Nieto C, Marcos CA, Sampedro A. (2005) *Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. Cell Oncol.,27(3):191–198.*

Hoeijmakers JHJ. (2001) *DNA repair mechanisms* Maturitas 38 17–23

Hu JJ, Mohrenweiser HW, Bell DA, Leadon SA, Miller MS (2002) *Symposium overview: Genetic polymorphism in DNA repair and cancer risk. Toxicology and Applied Pharmacology;185(1),64–73.*

Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD (2001) *Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. Carcinogenesis, 22, 917–922.*

Hu Z, Wei Q, Wang X, Shen H (2004) DNA repair gene XPD polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. Lung Cancer, 46,1–10.

Jałoszyński P, Jaruga P, Oliński R, Biczysko W, Szyfter W, Nagy E, Möller L, Szyfter K (2003) *Oxidative DNA base modifications and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in squamous cell carcinoma of larynx Free Radic Res. 37(3):231–340.*

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007) *Cancer statistics 2007 , 57 ,1, 43-66.*

Jennifer JH, Tasha RS, Mark SM, Harvey WM, Andrea G (2001) *Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity, Carcinogenesis, 22(6),9l7—922.*

Johnson JT, Myers EN (1991) *Cervical lymph node disease in laryngeal cancer. in: Silver CE, editor. Laryngeal cancer. New York: Thieme Medical Publishers mc, 22-26.*

Jurkiewicz D, Dzaman K, Rapiejko P (2006) *Laryngeal cancer risk factors , 21(121):94–98.*

Kepekçi H (1992) *Larenks anatomisi (çeviri). Ömür M, Önder D, Kalleli Ç, çeviri editörleri. Larenks kanseri ve boyun, Istanbul Haseki Hastanesi Vakfı Yayını, 1–7.*

Kirchner JA, **Carter D** (1999*) Pathology of the Larynx, Chapter 22: In Diagnostic Surgical Pathology. 3rd ed. Editor Sternberg S S.Lippincot Wiilliams & Wilkins. Philadelphia, Baltimore, Newyork. p: 925–948.*

Kiyosawa H, Suko M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto T, Chung MH, Kasai H, Nishimura S (1990) *Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes Free Radic Res Commun, 11(13), 23–27.*

Kodama M, Kaneko M, Aida M, Inoue F, Nakayama T, Akimoto H. (1997) *Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. Anticancer Res, 17, 433–438.*

Kubota Y, Nash R, Klungland A, Schar P, Barnes D, Lindahl T (1996) *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta 3 and the XRCC1 protein, EMBO J, 15,6662–6670.*

Larynx in: American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers, 1997, pp 41–46.

Lehmann AR (2001) The xeroderma pigmentosum group D (XPD) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes Dev*, 15,15–23.

Lei YC, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Luo JC, Chang MJ, Cheng TJ (2002) *Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers, Mutat Res, 519,93–101.*

Lewin F, Norell S., Johansson H., Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, Rutqvist L (1998) *Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case–referent study in Sweden, Cancer 82, 1367–1375*.

Li FC, Li YH, Zhao X, Fu WN, Xu ZM, Li ZG, Sun KL (2004) *Association of homozygous deletion of p15 and p16 gene and amplification of EGFR gene in laryngeal squamous cell carcinoma Yi Chuan Xue Bao. 31(2):109–113.*

Lindahl T, Karran P, Wood RD (1997) *DNA excision repair pathways , Current Opinion in Genetics & Development, 7, 158-169.*

Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM, Chang DY (2001) *Repair of oxidative DNA damage : mechanisms and functions. Cell Biochem Biophys, 35, 141–170.*

Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, Bell DA (2000) XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. Carcinogenesis, 21.551–555.

Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA (1999) *XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency, Cancer Res, 5, 2557–2561.*

Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD Weidauer H (1992) *Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer, Clin Investig ,70(3–4), 320–327.*

Maier H, Gewelke U, Dietz A, ve ark (1992) *Risk factors of cancer of the larynx: results of the Heidelberg case-control study, Otolaryngol Head Neck Surg, 107(4): 577–582*

Mason M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1998) *XRCC1 is specificaliy associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. Mol Cell Biol, 18, 3563—3571.*

Matullo G, Dunning AM, Guarrera S, Baynes C, Polidoro S, Garte S et all (2006) *DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study*

Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, et al (2001) XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*, 22,1437–1445.

Merati AL and Rieder AA (2003) *Normal Endoscopic Anatomy of the Pharynx and Larynx Am J Med, 115(3A):10S–14S.*

Mills SE (1997) *Fechner RE. Larynx and pharynx. In: Sternber SS, ed. Histology for Pathology. Second edition. Philadelphia, Newyork: Lipincott-Raven; p:391–409.*

Mohrenweiser HW, Carrano AV, Fertitta A, Perry B, Thompson LH, Tucker JD, Weber CA (1989) *Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, on human chromosome 19. Cytogenet Cell Genet, 52(1–2),11–14.*

Mohrenweiser HW, Jones IM (1998) *Variation in DNA repair is a factor in cancer susceptibility: A paradigm for the promises and perils of individual and population risk estimation, Mutat Res, 400, 15–24.*

Muscat J, Wynder E (1992) *Tobacco, alcohol, asbestos and occupational risk factors for laryngeal cancer, Cancer, 69, 2244–2251.*

Müftüoğlu M (2003) DNA Repair and Premature Aging Syndromes, *Turkish Journal of Biochemistry, 28 (1); 20-24.*

Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE, Lindahl T (1997) *XRCC1 protein interacta with one of two distinct forma of DNA ligase III, Biochemisiry, 36, 5207—5211.*

O'Donovan A, Davies AA, Moggs JG, West SC, Wood RD (1994) *XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair, Nature, 371, 432–435.*

Olshan A F, Watson M A, Weissler M C, Bell D A (2002) XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer Cancer Letters, 178, 181–186.

Park CH, Mu D, Reardon JT, Sancar A (1995) *The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIE transcription factor,J Biol Chem, 270, 4896-4902.*

Park SK, Kang D, Noh DY, Lee KM, Kim SU, Choi JY et all (2003) *Reproductive factors, giutathione Stransferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat,78: 89–96.*

Pavanello S, Clonfero E (2000) *Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms, Mutat Res, 463, 285–308.*

Peters ES, McClean MD, Marsit CJ, Luckett B, Kelsey KT (2006) *Glutathione S-transferase polymorphisms and the synergy of alcohol and tobacco in oral, pharyngeal, and laryngeal carcinoma, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev ,15 (11), 2196–202.*

Price EA, Bourne SL, Radbourne R, Lawton PA, Lamerdin J, Thompson LH, Arrand JE (1997) *Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with cancer in patients of varying radiosensitivity, Somatic Cell Mol Genet, 23, 237–247.*

Romina M, Elena F, Ulrich H (1998) *DNA Ligase I Selectively Affects DNA Synthesis by DNA Polymerases d and e Suggesting Differential Functions in DNA Replication and Repair. The journal of biological chemistry 273(23) ,5, 14322–14330.*

Rosai J (1996) *Ackerman's surgıcal pathology. 8th ed, St Louis: Mosby, 319–323.*

Rosai J (2004) *Larynx and trachea. Surgical Pathology. 9th ed. Edinburg London Newyork; p. 305–358.*

Schaeffer L, Moncollin V, Roy R, Staub A, Mezzina M, Sarasin A, Weeda G, Hoeijmakers JHJ, Egly JM (1994) *The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class-II BTF2/TFIIH transcription factor, EMBO J, 13, 2388–2392.*

Sgambato A, Campisi B, Zupa A, Bochicchio A, Romano G, Tartarone A, et all (2002) *Giutathione S-transferase (GST) polymorphisms as risk factors for cancer in a highly homogeneous population from southern Itaiy. Anticancer Res,22,3647–3652.*

Shah JP, Karnell LH, Hoffman HT, et al. (1997) *Patterns of care for cancer of the larynx in the United States. Arch Otolaryngol – Head Neck Surgery, 123, 475–483.*

Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H (1998) *Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans, Cancer Res, 58, 604–608.*

Shen MR, Zdzienicka MZ, Mohrenweiser H, Thompson LH. Thelen MP (1998) *Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair Nucleic Acids Research, 26, 4.*

Shi Q, Wang LE, Bondy ML, Brewster A, Singletary SE, Wei Q (2004) Reduced DNA repair of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced adducts and common XPD polymorphisms in breast cancer patients. *Carcinogenesis*, 25,1695–1700.

Shivji KK, Kenny MK, Wood RD (1992) *Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair, Cell,17;69(2),367–74.*

Shivji MKK, Podust VN, Hubscher U, Wood RD (1995) *Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC and RPA, Biochemistry, 34, 5011–5017.*

Sijbers AM, deLaat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, et al (1996) *Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease, Cell, 86, 811-822*.

Smith TR, Levine EA, Perrier ND, Miller MS, Freimanis RI, Lohman K, Case LD, Xu J, Mohrenweiser HW, Hu JJ (2003) DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 1200–1204.

social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity,

Sorohan T, Roberts PJ 1993 *Childhood cancer and paternal exposure to ionizing radiation: Preliminary findings from the Oxford Survey of Childhood Cancers. Am J Ind Med, 23,343–54***.**

Stary A, Sarasin A (2002) The genetics of the hereditary xeroderma pigmentosum syndrome, *Biochimie 84,49–60*.

Stern MC, Umback DM, van Gils CH, Lunn RM, Taylor JA (2001) *DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking and bladder cancer risk. Cancer Epidemiol,10(2),125–131.*

Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher A, Clayınan GL, Strom SS, Spitz, MR, Wei Q (1999) *Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck, Carcinogenesis, 20, 2125—2129.*

Sturgis EM, Zheng R, Li L, Castillo EJ, Eicher SA, Chen M, Strom SS, Spitz MR, Wei Q (2000) XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. Carcinogenesis, 21, 2219–2223.

Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, Hoeijmakers JHJ (1998) *Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair,. Mol Cell, 2, 223–232.*

Sung P, Véronique B, Weber C, Thompson L. H., Prakash L, Prakash S (1993) *Human Xeroderma Pigmentosum Group D Gene Encodes A DNA Helicase, Nature,365, 852 – 855.*

Szyfter K, Kujawski M, Dabrowski P, Jarmuz M, Kita S, Biegalski W, Szyfter W. (1999) *Chromosome damage in the course of laryngeal squamous cell carcinoma Otolaryngol Pol. 53(5):533–538*

Tang D, Cho S, Rundle A, Chen S, Phillips D, Zhou J, Hsu Y, Schnabel F, Estabrook A, Perera FP (2002) Polymorphisms in the DNA repair enzyme XPD are associated with increased levels of PAH-DNA adducts in a case-control study of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 75,159–166.

Taxy JB (1996) *Upper respiratory tract. in: Damjanow, Linder J, editors. Andersons pathology. lOth ed, St Louis: Mosby, 1463–1466.*

Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, Eng SM, Sagiv SK, Paykin AB, Wang Q, Hayes S, Teitelbaum SL, Neugut AI, et al. (2004) Polymorphism in the DNA repair gene XPD, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, cigarette smoking, and breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 13,2053–2058.

Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, Allen SA, Carrano AV (1990) *Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid Exchange, Mol Cell Biol, 10, 6160–6171.*

Thompson LH, West MG (2000) *XRCC1 keeps DNA from getting stranded, Mutat Res, 459, 1–18.*

Underwood JCE (1996) *General and systematic pathology. 2nd ed, New York: Churchill Livingstone,; 3370-3371.*

Varzim G, Monteiro E, Silva RA, Fernandes J, Lopes C (2003) *CYP1A1 and XRCC1 gene polymorphisms in SCC of the larynx European Journal of Cancer Prevention, 12.495–499.*

Vispe S, Yung TM, Ritchot J, Serizawa H, Satoh MS (2000) A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A , 29,97(18), 9886–9991.

Volker M, Moné MJ, Karmakar P, van Hoffen A, Schul W, Vermeulen W, et al (2001) *Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo, Mol Cell 8, 213–224.*

Weber CA, Slazar EP, Stewart SA, Thompson LH (1988) *Molecular cloning and biological characterization of a humangene,ERCC2 that corrects the nucleotide excision repair defect in CHO UV5 cells. Mol Cell Biol, 8, 1137–1146.*

Weeda G, Van Ham RCA, Vermeulen W, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JHJ (1990) *A presumed DNA helicase encoded by the excision repair gene ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's Syndrome, Cell, 62, 777–791.*

Wen SX, Tang PZ, Zhang XM, Zhao D, Guo YL, Tan W, Lin DX (2006) *Association between genetic polymorphism in xeroderma pigmentosum G gene and risks of laryngeal and hypopharyngeal carcinomas Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 28(5):703–736.*

Wenig BM. (1993) *Neoplasms of Larynx and Hypopharenx. In: Wenig BM ed. Atlas of Head and Neck Pathology. Philadelphia: Saunders; p 247.*

Wilson DM , Thompson LH (1997) *Life without DNA repair Proc Natl Acad Sci U S A, 25;94(24):13087–13092.*

Yoshie Y, Ohshima H (1997) *Synergistic induction of DNA strand brekage by cigarette tar and nitric oxide. Carcinogenesis,18, 1359–1363.*

Zdzienicka MZ (1995) *Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation-induced DNA damage, Mutat Res , 336(3), 203–213.*

Tablo 6 : *XRCC1 (Arg399Gln) ve XPD (Lys751Gln) polimorfik yapılarının ve birleştirilmiş genotiplerinin yaş, sigara ve TNM gruplarındaki dağılımı.*

Değişkenler	*XRCC1 (Arg399Gln)*			*XPD (Lys751Gln)*			*XRCC1* birleştirilmiş genotipler		*XRCC1 ve XPD*	
							Arg/Arg	Arg/Gln+Gln/Gln	Arg/Arg+Lys/Lys	Arg/Gln+Gln/Gln veya Lys/Gln
Yaş grubu										
≤ 59 (%) (n= 43)	47.8	46.7	40	43.9	48.1	0	*47.8*	*45.7*	*45.5*	*46.3*
>60 (%) (n=50)	52.2	53.3	60	56.1	51.9	0	*52.2*	*54.3*	*54.5*	*53.7*
	x^2 = 0.18, df=2, P = 0.91			x^2 =0.16, df=1, P =0.68			x^2 =0.03, df=1, P = 0.86 *OR = 1.08, (95% CI: 0.42–2.79)*		x^2 =0.003, df=1, P = 0.95 *OR =0.96, (95% CI: 0.27–3.41)*	
Sigara grubu										
1(%) (n=36)	47.8	35	40	36.6	40.4	0	47.8	*35.7*	*45.5*	*37.8*
2(%)(n=57)	52.2	65	60	63.4	59.6	0	*52.2*	*64.3*	*54.5*	*63.2*
	x^2 = 1.16, df=2, P = 0.56			x^2 = 0.13, df=1, P = 0.70			x^2 =1.07, df=1, P =0.30 *OR =1.65 , (95% CI: 0.63-4.2)*		x^2 =0.23, df=1, P =0.62 *OR =1.37 , (95% CI: 0.38–4.87)*	
Lokalizasyon										
Glottik (%) (n=44)	43.5	50	40	43.9	50	0	*43.5*	*48.6*	*45.5*	*47.6*
Supglottik (%) (n=49)	56.5	50	60	56.1	50	0	*56.5*	*51.4*	*54.5*	*52.4*
	x^2 = 0.52, df=2, P = 0.77			x^2 =0.34, df=1, P = 0.55			x^2 =0.18, df=1, P =0.67 *OR =0, 81, (95% CI: 0.31-2.10)*		x^2 =0.01, df=1, P =0.89 *OR =0, 91, (95% CI: 0.26-3.25)*	
T Sınıfı										
T1 (%) (n=15)	8.7	16.7	30	12.2	19.2	0	8.7	*18.6*	*9.1*	*17.1*
T2 (%) (n=17)	21.7	16.7	20	17.1	19.2	0	21.7	*17.1*	*18.2*	*18.3*
T3 (%) (n=48)	60.9	50	40	51.2	51.9	0	60.9	*48.6*	*63.6*	*50*
T4 (%) (n=13)	8.7	16.7	10	19.5	9.6	0	8.7	*15.7*	*9.1*	*14.6*
	x^2 = 3.8, df=6, P = 0.70			x^2 =2.37, df=6, 3 = 0.49			x^2 =2.36, df=3, P =0.50		x^2 =0.94, df=3, P =0.81	
N sınıflandırması										
N0 (%) (n=50)	47.8	55	60	51.2	55.8	0	*47.8*	*55.7*	*54.5*	*53.7*
N1 (%) (n=21)	21.7	25	10	19.5	25	2.9	*21.7*	*22.9*	*18.2*	*23.2*
N2 (%) (n=19)	21.7	18.3	30	29.3	13.5	0	*21.7*	*20*	*27.3*	*19.5*
N3 (%)(n=3)	8.7	1.7	0	0	5.8	0	*8.7*	*1.4*	*0*	*3.7*
	x^2 = 4.60, df=6, P = 0.59			x^2 =5.56, df=3, P = 0.13			x^2 =3, df=3, P =0.38		x^2 =0.79, df=3, P =0.85	

10. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. Yabancı dili İngilizcedir.

11. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca her türlü desteğini esirgemeyen danışmanım sayın Prof. Dr. Hasan ACAR'a, Tezimin deney materyalinin toplanmasında ve gerekli bilgilerin temininde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Kayhan Öztürk'e, tezimin değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Tülin CORA'ya, istatistiksel analizler yapılmasında Prof. Dr. Said BODUR ve Dr. Fatih KARA'ya ve ayrıca eğitimim boyunca bana maddi ve manevi destek olan ailemin her bir ferdine teşekkürü bir borç bilirim.