



---

**DENİZLİ VE YÖRESİNDE BAŞ, BOYUN VE ORAL KAVİTE  
TÜMÖRLÜ BİREYLERDE CYP2E1 VE ALDH2 GENETİK  
POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIĞA YATKINLIKLA  
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Metin Deniz KARAKOÇ**

**Aralık 2014**

**DENİZLİ**

**DENİZLİ VE YÖRESİNDE BAŞ, BOYUN VE ORAL KAVİTE  
TÜMÖRLÜ BİREYLERDE CYP2E1 VE ALDH2 GENETİK  
POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIĞA YATKINLIKLA  
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**


**Metin Deniz KARAKOÇ**

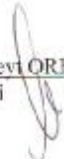
**Danışman: Prof. Dr. Selim KORTUNAY**

**Aralık, 2014  
DENİZLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU**


**Metin DENİZ KARAKOÇ** tarafından, Prof. Dr. Selim KORTUNAY yönetiminde hazırlanan "**Denizli Ve Yöresinde Baş, Boyun Ve Oral Kavite Tümörlü Bireylerde Cyp2e1 Ve Aldh2 Genetik Polimorfizmlerinin Hastalığa Yatkınlık İle İlişkisinin İncelenmesi**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Selim KORTUNAY  
Jüri Başkanı(Danışman)

  
Prof. Dr. Cüneyt ORHAN KARA  
Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. F. Farma BÖLÜKBAŞI HATİP  
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.1.15 tarih ve 2015/1 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza:

Öğrenci Adı Soyadı: Metin Deniz KARAKOÇ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Prof. Dr. Selim KORTUNAY'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim. Anabilim dalı başkanımız, Sn. Prof. Dr. İzzettin HATİP'e, anabilim dalımızın diğer değerli hocası; Sn. Doç. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP'e yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Tezimde yer alan hasta gruplarının toplanması sırasındaki yardımlarından dolayı, KBB Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. C. Orhan KARA ve Prof. Dr. Bülent TOPUZ'a teşekkür ederim. Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasındaki desteği ve özverili yardımlarından dolayı Biofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Doç. Dr. Aylin KÖSELER'e teşekkür ederim.

Eğitimim sırasındaki sonsuz sabır ve desteklerinden dolayı eşime ve kızıma teşekkür ederim.

Metin Deniz KARAKOÇ

## ÖZET

### DENİZLİ VE YÖRESİNDE BAŞ, BOYUN VE ORAL KAVİTE TÜMÖRLÜ BİREYLERDE CYP2E1 VE ALDH2 GENETİK POLİMORFİZMLERİNİN HASTALIĞA YATKINLIK İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Karakoç, Metin Deniz  
Yüksek Lisans Tezi Farmakoloji AD.  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Selim KORTUNAY

Aralık 2014, 69 Sayfa

Alkol tüketimi ve sigara alışkanlığı skuamoz hücreli baş ve boyun kanseri için risk artırıcı faktörlerdir. Çalışmamızda bu karsinojenlerin metabolik yollarında görevli CYP2E1 ve ALDH2 enzimlerine ait gen polimorfizmlerinin, bireylerin skuamoz hücreli baş ve boyun kanserine yatkınlıktaki rollerini inceledik. Epidemiyolojik özellikleri bakımından karşılaştırılabilir ve birbirleri ile uyumlu olan Denizli ve yöresinde yaşayan olgu (n=79) ve sağlıklı kontrol (n=98) grubu *ALDH2* (rs671) için multipleks PCR yöntemi kullanılarak ve CYP2E1 geni DraI (rs6413432), PstI (rs3813867), RsaI (rs2031920) polimorfizmleri için PCR-RFLP yöntemi kullanılarak genotip dağılımlarını belirledik. Yalnızca CYP2E1 RsaI polimorfizminde heterozigot (c1/c2) genotipli bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi (OR= 7,79; %95 GA, 0,92-179,64; p=0,04). Çalışmada incelenen diğer polimorfizmlerde anlamlı bir ilişki gözlenmedi. ALDH2 ve CYP2E1 geni polimorfizmleri için diğer Kafkas ırklarındaki çalışmalarla sonuçlarımız uyumludur. PstI/RsaI polimorfizmleri için ise Kafkas ırklarındaki sonuçlar çelişkilidir. Sonuç olarak RsaI için c1/c2 genotipi, skuamoz hücreli baş ve boyun kanseri için bir risk faktörü olabilir. Ancak yatkınlığın daha kesin bir şekilde ortaya konması için daha geniş bir olgu grubuna gereksinim vardır.

**Anahtar Kelimeler:** ALDH2, CYP2E1, baş ve boyun skuamoz hücre kanseri, gen polimorfizmi.

## ABSTRACT

### EXAMINATION OF THE SUSCEPTIBILITY TO DISEASE OF THE CYP2E1 AND ALDH2 GENETIC POLYMORPHISMS IN INDIVIDUALS WITH HEAD, NECK AND ORAL CAVITY TUMORS IN DENİZLİ AND ITS REGION.

Karakoç, Metin Deniz  
M. Sc. Thesis in Pharmacology  
Supervisor: Professor, MD. Selim KORTUNAY

December 2014, 69 Pages

Alcohol consumption and smoking habits are the risk enhancer factors for the squamous cell head and neck cancer. In our study we investigated the roles in genes polymorphisms at CYP2E1 and ALDH2 which are the responsible enzymes at metabolic pathways of these carcinogens and examined the susceptibility in individuals for squamous cell head and neck cancer. Comparable and matched with each other in point of epidemiological properties in cases (n=79) and healthy controls (n=98), were genotyped by using multiplex PCR method for *ALDH2* (rs671) and PCR-RFLP method for determining DraI (rs6413432), PstI (rs3813867), and RsaI (rs2031920) polymorphisms of *CYP2E1* genes in people who are living in Denizli and its region. We only determined a statistically significant association for CYP2E1 RsaI polymorphisms on heterozygous (c1/c2) genotypes (OR= 7,79; %95 CI, 0,92-179,64; p=0,04). The association of other polymorphisms under study was not observed. For ALDH2 and CYP2E1 genes polymorphisms our results are consistent with the studies which are conducted in Caucasian races. However, there are conflicting results in Caucasian races for RsaI/PstI polymorphisms. Consequently, c1/c2 genotypes for RsaI polymorphisms may be a risk factor in squamous cell head and neck cancer. But, there are needed larger case groups to demonstrate the susceptibility more precisely.

**Keywords:** ALDH2, CYP2E1, squamous cell head and neck cancer, gene polymorphism

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
Tez Onay Sayfası .....	i
Bilimsel Etik Sayfası.....	ii
Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler .....	vi
Şekiller Dizini.....	x
Tablolar Dizini.....	x
Simge ve Kısaltmalar Dizini.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	4
2.1.Baş ve boyun Kanserleri.....	4
2.1.1. Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Etiyoloji ve karsinogenez.....	5
2.1.2.1. Tütün ve alkol.....	5
2.1.2.2. Genetik etkenler.....	8
2.1.2.3. Virüsler.....	9
2.1.2.4. Diğer nedenler.....	9
2.1.3. Bölgeye ait kanser türleri .....	10
2.1.3.1. Oral kavite, nazal kavite ve paranazal sinüs kanserleri .....	10
2.1.3.2.Orofarinks ve nazofarinks kanserleri.....	10
2.1.3.3. Larinks kanserleri.....	11
2.1.3.4. Tükürük ve tiroid bezlerinde oluşan kanserler .....	11
2.1.3.5. Kulak ve temporal kemik kanserleri.....	11
2.2. ADH, CYP2E1 ve ALDH2 Enzimleri.....	12
2.2.1. ADH fizyolojik fonksiyonları ve polimorfizmleri.....	12
2.2.2. CYP2E1 fizyolojik fonksiyonları ve polimorfizmleri .....	14
2.2.3. ALDH2 fizyolojik fonksiyonları ve polimorfizmleri.....	16



2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği (PCR).....	17
2.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun oluşum mekanizması .....	17
2.3.2. PCR'ın temel bileşenleri .....	19
2.3.2.1. Kalıp DNA.....	19
2.3.2.2. Polimerazlar ve primerler.....	20
2.3.2.3. Deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP).....	20
2.3.2.4. Tamponlar ve MgCl <sub>2</sub> .....	20
2.3.2.5. PCR inhibitörleri.....	21
2.4. Elektroforez .....	21
2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri.....	21
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1 Materyal.....	22
3.1.1 Hasta ve kontrol gruplarının toplanması.....	22
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	23
3.1.3. Kullanılan enzim ve kimyasal maddeler.....	23
3.1.4. Primerler.....	24
3.2. Metot.....	25
3.2.1. Tam kan numunelerinden genomik DNA'nın izolasyonu.....	25
3.2.2. Genomik DNA'nın spektrofotometrik analizi.....	26
3.2.3 Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile saflık kontrolü.....	27
3.2.4. PCR işlemi.....	28
3.2.4.1. C-1019T/G-1259C tek nükleotid polimorfizmleri.....	28
3.2.4.2. T7678A tek nükleotid polimorfizmi.....	30
3.2.4.3. <i>ALDH2</i> geni G1510A tek nükleotid polimorfizmi .....	32
3.3. <i>CYP2E1</i> geni PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.....	34
3.3.1 C-1019T tek nükleotid polimorfizminde <i>RsaI</i> endonükleaz kesimi.....	35
3.3.2 G-1259C tek Nükleotid Polimorfizminde <i>PstI</i> Endonükleaz kesimi.....	37
3.3.3 T7678A tek nükleotid polimorfizminde <i>DraI</i> endonükleaz kesimi.....	39
3.4. İstatiksel Değerlendirme.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. <i>CYP2E1</i> Geni C-1019T/G-1259C Polimorfizmlerinde Genotipleme.....	43
4.1.1. C-1019T ( <i>RsaI</i> ) polimorfizmi.....	43
4.1.2. G-1259C ( <i>PstI</i> ) Polimorfizmi.....	45

4.2. <i>CYP2E1</i> Geni T7678A Polimorfizminde Genotipleme .....	46
4.3. <i>ALDH2</i> Geni G1510A Polimorfizminde Genotipleme.....	48
4.4. Gruplararası örneklem karakteristiklerinin karşılaştırılması.....	48
5.TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ.....	57
7. KAYNAKLAR.....	58
8. ÖZGEÇMİŞ.....	69

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1 Alkol metabolizması sonucu oluşan ürünler .....	3
Şekil 2.1 Baş ve boyun bölgesinde kanser riski olan bölgeler .....	10
Şekil 2.2 Etanol ve asetaldehidin oksidatif metabolizması .....	13
Şekil 2.3 <i>CYP2E1</i> polimorfizm bölgelerinin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.4 PCR reaksiyonunun işleyişine ait şema.....	19
Şekil 3.1 Elektroforezde DNA örneklerinin görünümü .....	28
Şekil 3.2 <i>CYP2E1</i> geni 5' sınır bölgesi C-1019T/G-1259C polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü.....	30
Şekil 3.3 <i>CYP2E1</i> geni 5' sınır bölgesi T7678A polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü.....	31
Şekil 3.4 <i>ALDH2</i> geni G1510A polimorfizminde kullanılan primerlerin yerleşim bölgeleri.....	32
Şekil 3.5 <i>ALDH2</i> geni G1510A tek nükleotid polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü.....	33
Şekil 3.6 PCR ile çoğaltılmış <i>CYP2E1</i> geni 5' sınır bölgesi C-1019T / G-1259C polimorfizmi içeren sekanslar.....	35
Şekil 3.7 <i>CYP2E1</i> geni <i>RsaI</i> kesimi bant kalıpları için şematik gösterim.....	36
Şekil 3.8 <i>CYP2E1</i> geni 5'sınır bölgesi PCR ürünün <i>RsaI</i> restriksiyon endonükleaz ile kesilmesinden sonra elde edilen jel görüntüsü.....	37
Şekil 3.9 <i>CYP2E1</i> geni <i>PstI</i> kesimi bant kalıpları için şematik gösterim.....	38
Şekil 3.10 <i>PstI</i> kesim ürünlerinin jel elektroforezinde görünümü.....	39
Şekil 3.11 <i>CYP2E1</i> T7678A polimorfizminde intron 6 bölgesi nükleotid sekansı.....	40
Şekil 3.12 <i>CYP2E1</i> geni <i>DraI</i> kesimi bant kalıpları için şematik gösterim.....	41
Şekil 3.13 <i>CYP2E1</i> geni <i>DraI</i> kesim ürünlerinin jel elektroforezinde görünümü.....	41

## TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Baş ve boyun tümör tipleri .....	5
Tablo 2.2 Tütün dumanında bulunan karsinojen tipleri .....	7
Tablo 2.3 CYP2E1 enzimi substrat, indükleyici ve inhibitörleri .....	14
Tablo 2.4 CYP2E1 polimorfizmleri .....	15
Tablo 2.5 Aldehid dehidrojenaz 2 enzimi polimorfizmleri .....	17
Tablo 3.1 <i>CYP2E1</i> geni C-1019T/G-1259C tek nükleotid polimorfizmleri için PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol.....	29
Tablo 3.2 <i>CYP2E1</i> geni C-1019T/G-1259C polimorfizminde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için ideal hacim ve konsantrasyonları.....	29
Tablo 3.3 <i>CYP2E1</i> geni intron 6 bölgesi T7678A tek nükleotid polimorfizmi için PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol.....	30
Tablo 3.4 <i>CYP2E1</i> geni T7678A polimorfizminde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için kullanılan ideal hacim ve konsantrasyonları.....	31
Tablo 3.5 <i>ALDH2</i> geni G1510A tek nükleotid polimorfizmi için PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol.....	32
Tablo 3.6 <i>ALDH2</i> geni G1510A tek nükleotid polimorfizminde PCR için kullanılan ideal koşullar.....	33
Tablo 3.7 <i>CYP2E1</i> geni tek nükleotid polimorfizmleri ve bunlara karşılık gelen restriksiyon enzimleri ile tanıma bölgeleri.....	34
Tablo 3.8 <i>RsaI</i> kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları.....	36
Tablo 3.9 <i>PstI</i> kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları.....	38
Tablo 3.10 <i>DraI</i> kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları.....	39
Tablo 4.1 <i>CYP2E1</i> geni 5' sınır bölgesi C-1019T ve G-1259C tek nükleotid polimorfizmlerine ait genotipler.....	43
Tablo 4.2 BBT grubu C-1019T ( <i>RsaI</i> ) polimorfizmi genotip ve alel frekansları.....	44
Tablo 4.3 SK grubu C-1019T ( <i>RsaI</i> ) polimorfizmi genotip ve alel frekansları.....	44
Tablo 4.4 C-1019T ( <i>RsaI</i> ) polimorfizminde olgu ve kontrol grupları arasında genotip-alel dağılımı ve karşılaştırmalı değerler.....	44

Tablo 4.5 <i>CYP2E1</i> Geni 5' sınır bölgesi G-1259C (PstI) tek nükleotid polimorfizmi olgu grubu genotip ve alel frekansları.....	45
Tablo 4.6 <i>CYP2E1</i> Geni 5' sınır bölgesi G-1259C (PstI) tek nükleotid polimorfizmi sağlıklı kontrol grubu genotip ve alel frekansları.....	45
Tablo 4.7 G-1259C (PstI) polimorfizminde olgu ve kontrol grupları arasında genotip-alel dağılımı ve karşılaştırmalı değerler.....	46
Tablo 4.8 <i>CYP2E1</i> geni intron 6 bölgesi T7678A tek nükleotid polimorfizmine ait genotipler.....	46
Tablo 4.9 BBT grubu T7678A (DraI) polimorfizmi genotip ve alel frekansları.....	47
Tablo 4.10 SK grubu T7678A (DraI) polimorfizmi genotip ve alel frekansları.....	47
Tablo 4.11 T7678A (DraI) polimorfizminde olgu ve kontrol grupları arasında genotip ve alellerin dağılımı ve karşılaştırmalı değerler.....	47
Tablo 4.12 Olgu ve kontrol gruplarının karakteristik özellikleri.....	48
Tablo 5.1 Çeşitli kontrol popülasyonlarında <i>CYP2E1</i> geni C-1019T (RsaI) polimorfizmi genotip frekansı dağılımları.....	51
Tablo 5.2 Çeşitli kontrol popülasyonlarında <i>CYP2E1</i> geni G-1259C (PstI) polimorfizmi genotip frekansı dağılımları.....	53
Tablo 5.3 <i>CYP2E1</i> geni intron 6 bölgesi DraI polimorfizmi için çeşitli ırklara ait kontrol gruplarında genotip ve alel frekansı dağılımı.....	54
Tablo 5.4 <i>ALDH2</i> (rs671) polimorfizmi için çeşitli ırklara ait kontrol gruplarında genotip ve alel frekansı dağılımı.....	56

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
ADH1C	Alkol dehidrojenaz 1C
ALDH2	Aldehid dehidrojenaz 2
BBT	Baş ve boyun Tümörü
bç	Baz çifti
CCl <sub>4</sub>	Karbon tetra klorür
CYP1A1	Sitokrom P4501A1
CYP2D6	Sitokrom P4502D6
CYP2A6	Sitokrom P4502A6
CYP2E1	Sitokrom P4502E1
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dSTP	Deoksisitidin trifosfat
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
Fe <sup>+3</sup>	+3 değerlikli demir iyonu
GABA	Gama amino butirik asit
Glu	Glusin
GST	Glutatyon S-transferaz
HER	Hidroksi etil radikalleri
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HPV	Human papilloma virüs
Kb	Kilobayt
KBB	Kulak, burun, boğaz
KCl	Potasyum klorür
Liz	Lizin
MAA	Asetaldehid-protein ürünleri
m.a.m.	Moleküler ağırlık markırı
MDA	Malondialdehid
Mg <sup>+2</sup>	+2 değerlikli magnezyum iyonu
mM	Milimolar
mm	Milimetre
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAT	N-asetil transferaz
NFK	Nazofarink kanseri
nm	Nanometre
O.Y.	Optik yoğunluk
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri
RNA	Ribonükleik asit

Rpm	Dakikadaki tur sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SK	Sağlıklı kontrol
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
STE	Salin-tris-EDTA çözeltisi
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-borat-EDTA
Tris-Cl	Hidroksimetilaminometan-klorür
UV	Ultraviyole
Vd	Ve diğerleri
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Gama
$\chi^2$	Ki-kare

## 1. GİRİŞ

Denizli ve yöresinde yaşayan baş ve boyun tümörlü bireylerde hastalık etiolojisinde sorumlu tutulan alkolün metabolizmasına ait CYP2E1 ve ALDH2 enzim polimorfizmlerinin hastalığa yatkınlıktaki rolünü ortaya koymak için olgu ve kontrol grubundaki alel ve genotip frekanslarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Kanser, somatik hücre DNA'sında fiziksel, kimyasal, viral veya spontan etkenler nedeniyle gelişebilen mutasyonlar sonucu bu hücrelerin organizmanın denetim mekanizmalarından bağımsız olarak ve anormal şekilde çoğalmasındır. Kanser kelimesi tek bir hastalığın değil, temel neden olan malign tümörlerin tümüne verilen genel bir isimdir. Genel olarak ksenobiyotik olarak adlandırılan çok sayıda kimyasal bileşiğin kendisi veya metaboliti DNA'yı etkileyebilir. Maruziyet sürekli veya belli periyodlarla devam eder ise kanser oluşumuna neden olabilir. Kanserlerin yaklaşık %80'i çevresel kimyasal madde maruziyeti sonucu oluşmaktadır (Matthias vd 1998).

Baş ve boynun skuamoz hücreli karsinomu, anatomik olarak bu bölgeye yerleşen tüm maligniteler içerisinde oral kavitedekilerin %40'ı, farinkstekilerin %15'i, larinkstekilerin %25'i ve diğer kısımların (tükürük bezi ve tiroid) %20'sini oluşturur (Ragin vd 2007). Skuamoz hücreli karsinomlar, baş ve boyun tümörlü olgularda en sık karşılaşılan histolojik tiptir (Olivieri vd 2009). Baş ve boyun kanserlerinin içerisinde dünya'da en sık görülen alt tür, tüm kanserler içinde % 2,1 pay ile oral kavite ve dudak kanserleri iken yurdumuzda en sık görülen alt tür ise tüm kanserler içerisinde %1,9 pay ile larinks kanseridir. Türkiye'de erkeklerde görülen kanserler arasında 6. sıklıkta yer aldığı ve erkeklerde kansere bağlı ölümlerin % 3,3'ünden sorumlu olduğu belirtilmektedir (WEB\_1 2014). Bu hastalıkta, sigara ve alkol alışkanlıkları, başlıca risk faktörleridir (Hiyama vd 2008, Olivieri vd 2009). Çalışmalar, sigara içerisindeki çok sayıda karsinojenin ve alkol metabolizmasıyla oluşan aktif ürünlerin vücuda zararlı etkilerini çok net bir şekilde ortaya koymuştur. Bu zararlı reaktif ürünler, dokularda oksidatif strese yol açabilir ve hücrede proteinler, karbonhidratlar, lipidler ve DNA'da

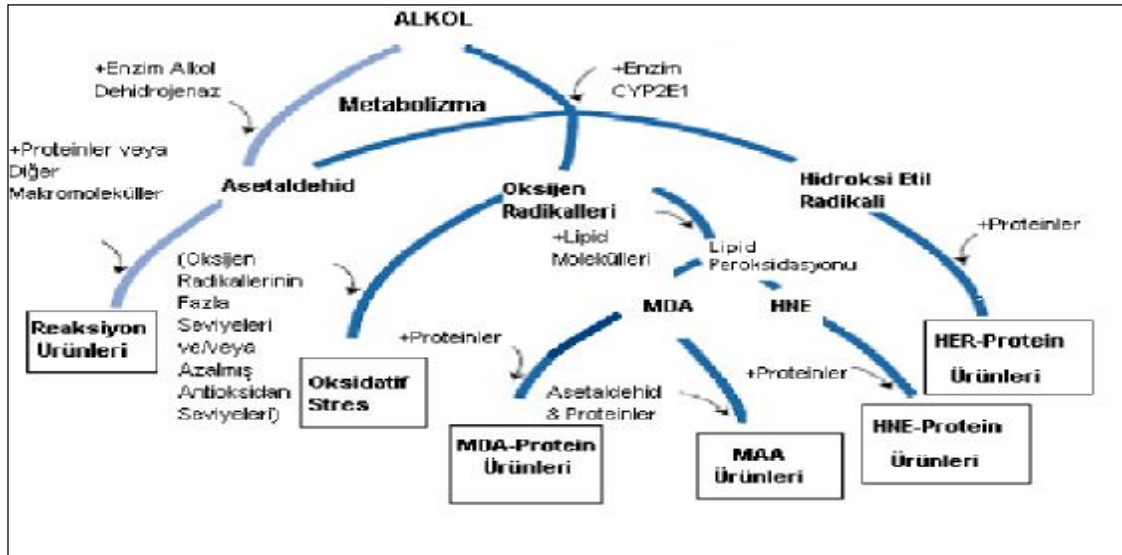


hasar oluşabilir. Sonuçta mutasyon ve hücre döngüsünde değişme meydana gelir (Zain 2007).

Sigara ve alkol gibi ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerde değişiklikler meydana gelebilir. Bu değişiklikler, enzim aktivitesinin artmasına, azalmasına veya yokluğuna neden olabilir. Genlerdeki kalıtılabilen alelik farklılıkların popülasyonun %1'in den fazlasında görülmesine polimorfizm denir (Miller vd 2003).

Alkol, alkol dehidrojenaz (ADH) ve CYP2E1 tarafından asetaldehide, asetaldehid ise aldehid dehidrojenaz (ALDH) tarafından asetata dönüştürülür (Salway 1994). *ADH* ve *ALDH* genleri için polimorfizmler söz konusudur. Farklı popülasyonlarda varyant alel ve genotip sıklıkları da farklılık gösterir. Bu genetik polimorfizmler, bireyler arasındaki alkol metabolizma hızındaki farklılığın ve akut alkol alımı sonrası gözlenen advers reaksiyonların oluşmasına katkı sağlarlar (Nussbaum vd 2005). ADH ve ALDH aktivitelerinin değişmesi, oluşan asetaldehid miktarını etkiler. Dokularda artmış asetaldehid miktarlarına maruz kalmak ise, baş ve boyun kanserleri riskini artırıcı bir faktör olarak ortaya çıkar. Bu durumu açıklayan çeşitli deneysel hayvan çalışmaları ile asetaldehidin karsinojenitesi gösterilmiştir (Seitz ve Stickel 2007).

Günümüze kadar, insanlarda 12 farklı ALDH tanımlanmıştır. Bunlardan sitozolik ALDH1 ve mitokondriyal ALDH2 en önemlileridir. ALDH2 enzimi 4 alt birimden oluşur ve bu alt birimlerden herhangi biri defektif ise enzim inaktiftir (Crabb vd 1989). ALDH2 eksikliği olan bireyler, alkol aldıklarında başlangıçta, kanda asetaldehid birikerek yüzde kızarmaya neden olur. ALDH eksikliği otozomal dominant kalıtım gösterir. Çinliler'de görülme frekansı %45'lere ulaşırken, Afrikalılarda ve beyaz ırkta gözlenmez. Bu nedenle uzak doğulular asetaldehidi daha yavaş yıkarlar. Alkol metabolizmasına ait basamaklar ve oluşan ürünler Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



**Şekil 1.1** Alkol metabolizması sonucu oluşan ürünler (Tuma ve Casey 2003)

Kronik alkol tüketiminde alkol metabolizmasında ADH'nın yanı sıra adaptif bir mekanizma olarak düz endoplazmik retikulumda yer alan, indüklenebilen CYP2E1 enzimi de önemli rol oynamaktadır. İnsan *CYP2E1* geni 10. Kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir (Umeno vd 1988).

ALDH2 ve CYP2E1 enzimlerinin ve alkolün vücuda alınışından atılışına kadar geçen süreçteki metabolizma basamaklarında rol alan diğer enzimlere ait polimorfizmlerin baş ve boyun kanserlerine yatkınlıkta rolleri ile ilgili farklı popülasyonlarda birbiriyle çelişkili sonuçları olan çalışmalar mevcuttur (Gajecka vd 2005, Brocic vd 2011, Ji vd. 2011, Cury vd 2012). Gajecka ve Cury, CYP2E1 polimorfizmleri ile baş ve boyun tümörlerine yatkınlık ilişkisini bulamamıştır. Kafkas ırkında yapılan bir çalışmada CYP2E1 RsaI polimorfizminde c2 mutant alel frekansında baş ve boyun kanseri için risk artışı bulunduğu bildirilmiştir (Bouchardy vd 2000). Yine Kafkas ırklarında CYP2E1 DraI C mutant alel frekansında da baş ve boyun kanseri için istatistiksel olarak anlamlı risk artışı bulunmuştur (Lucas 1996, Bouchardy vd 2000). Yapılan bir çalışmada ALDH2 polimorfizminin baş ve boyun kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Matsuo vd 2012). Türk toplumunda ise ALDH2 ve CYP2E1 polimorfizmlerinin baş ve boyun tümörlerine yatkınlık ilişkisi incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda baş ve boyun kanserli olgular ile epidemiyolojik özellikleri benzer olan kontrol grubu kullanılmıştır. Bu konu yakın yıllardaki çalışmalar da göz önüne alındığında halen güncelliğini korumaktadır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Baş ve boyun Kanserleri

#### 2.1.1. Epidemiyolojisi

Ağız ve burun boşlukları, tükürük bezleri, paranasal sinüsler, farinks (nazofarinks, orofarinks, hipofarinks), larinks ve boynun üst kısmındaki lenf nodüllerindeki tümörler, baş ve boyun kanserleri olarak adlandırılmaktadır (Bilgel 2003). En sık tümör görülen bölgeler, oral kavite, farinks, larinks ve hipofarinkstir. Nazal kavite ile paranasal sinüs kanserleri, tükürük bezi maligniteleri, çeşitli sarkomlar, lenfoma ve malign melanomlara ise daha az rastlanır. Bu kanserlerin %90'ı skuamoz hücreli kanserlerdir (Abraham vd 2009).

Baş ve boyun kanserleri, dünyada tüm kanserler arasında 6. sıklıkta görülür. Hastaların çoğu, 50 yaş üstü kişilerdir. İnsidans, yaşla birlikte artarak 60-75 yaş arasında en yüksek sıklığa ulaşır. Dünya Sağlık Örgütü'nün son açıkladığı verilere göre gelişmekte olan ülkelerde diğer bölgelere göre nispeten daha sık görülür (WEB\_1 2014).

Skuamoz hücreli baş ve boyun kanserlerinin dünya genelinde insidansı yılda 600.000 olgudan fazladır. Hastalık erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür. Dünya genelinde erkek/kadın oranı 3/1, ülkemizde ise 4,4/1'dir. Baş ve boyun kanserleri dünyada görülme insidansı açısından tüm kanser türleri içerisinde yılda %4,8 'lik paya sahiptir. Yıllık mortalite insidansı ise 4,6'dır. Türk popülasyonunda ise bu değerler sırası ile 3,8 ve 2,5'tur (WEB\_1 2014).

Dünya genelinde erkeklerde en sık görülen baş ve boyun kanseri türü, ağız boşluğu kanserleridir. Kadınlarda ise en çok karşılaşılan baş ve boyun kanseri türü orofarinks ve hipofarinks kanserleridir. Türkiye'de ise baş ve boyun kanserleri içinde en sık görülen kanser; larinks kanseridir ve erkeklerde daha çok görülmektedir (Bilgel 2003, WEB\_1

2014). Baş ve boyun tümörlerinden sıkça görülen örnekleri Tablo 2.1'de özet olarak sunulmuştur.

**Tablo 2.1** Baş ve boyun tümör tipleri (Hanna vd 2012) (Kaynaktan özetlenmiştir)

Benign		Malign primer		Malign sekonder
Glomus tümörü, Psödötümör, Fibroma, Papilloma, Granülom	Juvenil anjiofibrom, Lenfanjinoma, Anjinom, Adenom, Hemanjinom	Skuamoz karsinom, Adenokarsinom, Mukoepidermoid, adenoid kistik ve asinik hücre karsinomları (tükürük bezleri)	Kaposi dahil yumuşak doku sarkomları, Hodkin ve non- hodkin lenfomalar, Bazal hücre karsinomu	Renal hücreli kanser, tiroid, meme, akciğer, prostat veya gastrointestinal sistem tümörlerinin metastazı

### 2.1.2. Etiyoloji ve karsinogenez

Normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi, birçok basamak içerir. DNA'da ardi ardına meydana gelen mutasyonlar sonucu genetik materyalde değişiklikler oluşur. Bunda protoonkogenlerin ve supresor genlerin etkin olduğu düşünülür. Bu genler normal hücrelerde hücrel kayıpların tamirinde birlikte görev alır. Bunlarda meydana gelen mutasyonlar hücrenin büyümesini ve çoğalma programını etkiler (Indulski ve Lutz 2000). Baş ve boyun tümörlerinin karsinogenezi de pek çok faktörün dinamik etkileşimi sonucu ortaya çıkan kompleks bir süreçtir. Olguların %90'ında bilinen karsinojenlere maruziyet öyküsü bulunmaktadır. Bu karsinojenlerin başında tütün, alkol ya da bettel yaprakları gibi alışkanlıklar gelmektedir. Alkol, aynı zamanda tütün ve benzeri karsinojenlerin etkisini de arttıran en önemli faktördür. Diğer önemli etiyolojik faktörler ise, virüsler, genetik yatkınlık, hava kirliliği, radyasyon maruziyeti ve diyet olarak sıralanabilir (Engin ve Özkan 2003).

#### 2.1.2.1. Tütün ve alkol

Tütün ve alkol, kanser gelişimi için temel risk faktörleridir. Sigara içmek, riski cinsiyet, ırk ve içilen miktara bağlı olarak 5-25 kat artırırken; yoğun alkol tüketimi riski 2-6 kat artırmaktadır. Her iki faktör birlikte riski 15 kattan 40 kata kadar artırmaktadır (Abraham vd 2009).

Kullanılan tütün ve alkol miktarının artmasıyla, birlikte baş ve boyun kanserlerinin görülme sıklıkları da giderek artmaktadır. Dolayısıyla maruziyetin daha fazla olduğu erkeklerde, kadınlara göre bu kanser çeşitlerine daha sık rastlanmaktadır (Bilgel 2003).

Tütün kullanımı, kansere bağlı ölümlerin ana etkeni olarak bilinmektedir. Erkeklerde yaklaşık olarak tüm kanserlerin %25'i, kadınlarda ise %4'ünden sorumlu tutulmaktadır. Aynı değer, cinsiyet ayırmaksızın incelendiğinde gelişmiş ülkelerde %16, az gelişmiş ülkelerde ise %10 civarındadır (Sasco vd 2004). Sigara kullanımı ile baş ve boyun kanserleri arasındaki doz-etki ilişkisinde kullanım süresinin, sonuca katkısının günlük kullanılan sigara sayısından daha önemli olduğu bildirilmiştir. Tütünün üretimi ve işlenmesi aşamalarında kullanılan katkı maddeleriyle birlikte sigarada 4000'den fazla bileşik olduğu saptanmıştır. Deneysel çalışmalar, sigara olarak içilen tütünde bu maddelerden en az 55 adedinin kanserojen etkili olduğunu, yanmamış tütünde ise en az 16 karsinojen madde bulunduğunu göstermiştir (Engin ve Özkan 2003, Hetch 2003). Sigara kullanırken ortaya çıkan katranın, dudak ve ağız boşluğu kanserlerinde rolü olduğu düşünülmektedir (Engin ve Özkan 2003). Sigara ve pipo kullanımı başta olmak üzere tüm tütün kullanım biçimlerinin baş ve boyun kanserlerindeki rolünün akciğer kanserlerindeki daha çok olduğu düşünülmektedir. Katranın bileşimindeki karsinojenler, tükürük vasıtasıyla karsinogenezi başlatmaktadır. Bilhassa pipo kullananlarda alt dudak kanserlerine daha çok rastlanılmaktadır (Engin ve Özkan 2003). Yüksek katran ve yüksek nikotin seviyelerine sahip sigaraların, düşük nikotin seviyesine sahip sigara içen kişilere göre larinks kanserine yakalanma riski daha yüksektir (Szyfter vd 1999).

Tütün kullanımının en yaygın iki şekli sigara ve tütün çiğnemedir. Dünyada yaklaşık bir milyar insanın sigara kullandığı ve 600 milyon kişinin de tütün çiğnediği düşünülmektedir. Yapılan araştırmalarda A.B.D'de sigara dışı tütün kullanımının gençlerde ve kadınlarda hızlı bir artış gösterdiği ve bunun, ülkedeki ağız boşluğu kanserlerindeki artışla ilgili olduğu düşünülmüştür (Engin ve Özkan 2003). Ülkemizde ise son yıllarda devletin yürüttüğü bilinçlendirme faaliyetleri neticesinde tütün kullanım oranı azalmaktadır. Dolayısı ile aynı ilişki kurulamamaktadır (WEB\_4 2012).

Sigara kullanımının daha yaygın olduğu ülkelerde oral kavite ve hipofarinks kanserleri tüm kanserlerin sadece %3'ünü oluştururken, bettel yaprağı ve areca cevizi

(Areca catechu) gibi yöresel bitkilerin ağızda çiğneme alışkanlığının yaygın olduğu Güneydoğu Asya ülkelerinde, oral kavite ve hipofarinks kanserleri, tüm kanserlerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Areca cevizi içerisindeki önemli alkaloidlerden olan arekolin, arekaidin, guvasin ve guvakolin başta beyin olmak üzere birçok dokuda GABA reseptör inhibitörü olarak etki gösterirler. Bu alkaloidler bağımlılık yapıcı ve kanserojen etkilerden sorumludur (Engin ve Özkan 2003, Akhtar 2012).

Yalnızca sigara dumanında yanma sonucu oluşan kimyasal maddelerin değil, yanmamış tütündeki maddelerinde kansere neden olduğu tespit edilmiştir. Sigara dumanında 60'tan fazla karsinojen, yanmamış tütünde ise en az 16 adet karsinojen madde saptanmıştır. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), nitrozaminler ve aromatik aminler, sigarada bulunan en genel kuvvetli karsinojenlerdir. Bir sigarada bulunan toplam karsinojen miktarı 1 ila 3 mg arasındadır. Bu miktar, sigara başına düşen nikotin miktarı ile yaklaşık aynıdır (Hecht 2003). Sigara dumanı gaz ve partikül fazı olarak iki fazda incelenir. Bu fazların içerdiği kimyasal maddelerden bazıları Tablo 2.2 'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2** Tütün dumanında bulunan karsinojen tipleri (Hastürk ve Yüksel 2000)

Partikül fazı		Gaz fazı	
Nikotin	Kresol	Karbon monooksit	Karbondioksit
Katran	Fenol	Nitrojen oksitler	Nitrozaminler
Aromatik hidrokarbonlar	b-Naftilamin	Aldehitler	Hidrazin
Benzo(a)piren	Benz(a)antrasen	Amonyak	Aseton
Kateşol	İndol	Akrolein	Vinil klorid
Karbazol	Anilin	Hidrosiyamik asit	Pridin
Nikel	Polonyum-210		
N-nitrozodimetilamin	N-nitrozopirolidin		
2-Toluidin	Qunolin		

Baş ve boyun kanserinin bir başka tetikleyicisi olan alkolün, tütünün etkisini potansiyelize eden bir kofaktör olduğu genel kanıdır. Her ikisi birlikte kullanıldığında sinerjistik etki, yani tütün ve alkolün ayrı ayrı kullanımlarında ortaya çıkan risk artışının toplamından daha fazla olduğu bildirilmektedir (Engin ve Özkan 2003). Sigara veya alkolden yalnızca birini kullanan bireylerde ve her ikisini birlikte tüketenlerde, hiçbirini kullanmayan bireylere göre oral kavite kanseri riski sırasıyla 3-9 ve 100 kat arttığı belirtilmiştir (Sasco vd 2004).

Sekiz Avrupa ülkesinde 350.000'den fazla sayıda kişinin değerlendirme altına alındığı 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada alkol kullanımının ağız boşluğu, farinks, larinks ve özefagus kanserlerinin gelişme riskini arttırdığı gösterilmiş ve alkol kullanımının erkeklerde görülen kanserlerin %10'undan, kadınlarda ise %3'ünden sorumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Schütze vd 2011).

2013 yılında yayınlanan bir derlemede alkol kullanımının bırakılmasının larinks ve farinks kanseri gelişme riskinde yıllık ortalama %2'lik azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Alkolün bırakılmasının ardından beşinci yılın sonunda larinks ve farinks kanseri gelişme riskinde ortalama %15 azalma olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak alkole bağlı larinks ve farinks kanseri gelişme riskindeki artışın geri dönüşlü olduğu ancak bu riskin hiç alkol kullanmamış olanlar ile eşit düzeye gelmesinin 36-39 yıl aldığı bildirilmiştir (Ahmad Kiadaliri vd 2013).

#### **2.1.2.2. Genetik etkenler**

Baş ve boyun kanserlerinde alkol ve sigaranın bileşiminde bulunan kanserojen etkileri kanıtlanmış maddelerin metabolizmasında yer alan genlerin polimorfizmleri, zararlı bileşiklerin vücuttan uzaklaştırılmasında bozukluklara neden olduğundan önemlidir. Faz I metabolizmasında görev alan CYP1A1, CYP2D6, CYP2A6, CYP2E1 enzimleri ve faz II enzimlerinden Glutasyon S-transferaz (GST), N-Asetil transferaz (NAT), ADH1C ve ALDH2 enzimlerinin baş ve boyun kanserleri ile ilişkisi birçok bilim insanı tarafından araştırılmıştır. Güncel bir çalışmada, CYP1A1 ve CYP2D6 enzimlerindeki polimorfizmlerin baş ve boyun kanserine yakalanma riskini belirgin derecede arttırdığı bildirilmiştir (Khlifi vd 2014). Diğer bir araştırmada baş ve boyun kanseriyle CYP1A1 Ile462Val polimorfizmlerinin yatkınlıkla ilgili olmadığı ancak CYP1A1 MspI polimorfizmlerinin yatkınlık faktörü olduğu saptanmıştır (Liu vd 2013). Bir meta-analizde GSTT1 ve GSTM1 genotiplerindeki polimorfizmlerin baş ve boyun kanserine yatkınlıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hashibe vd 2003). CYP2A6 ve GSTP1 polimorfizmlerinin ise yalnızca baş ve boyun kanserine yatkınlığı arttırmakla kalmadığı, vücudun kemoterapötiklere verdiği cevapta da değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Ruwali vd 2009). Türk populasyonunda yapılan bir çalışmada hızlı asetilatör NAT2\*4/NAT1\*10 diplotipiyle baş ve boyun kanseri riski arasında belirgin bir ilişki saptanmıştır (Demokan vd 2010).

Son yıllarda p53 genindeki mutasyonların, sigara ve alkol kullanma öyküsü bulunan baş ve boyun kanserli hastalarda daha sık gözleendiği rapor edilmiştir (Mao vd 2004). Ayrıca, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) HER2 proteinini kodlayan c-erbB2 genlerinin baş ve boyun kanserlerinde fazla eksprese edildikleri gösterilmiştir (Zavras vd 2003).

### **2.1.2.3. Virüsler**

Human papilloma virüs (HPV) ve Ebstein-Barr virüslerinin baş ve boyun kanserleri ile ilişkili olduğuna dair değişik araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarla elde edilmiş bulgular mevcuttur. Genetik çalışmalar HPV 6, 11, 16 ve 18 tiplerinin baş ve boyun kanseri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. HPV pozitif olan baş ve boyun kanserlilerde HPV tip 16 ve tip 18 en çok karşılaşılan türlerdir. Yapılan çalışmalarda HPV varlığının, skuamoz hücreli baş ve boyun kanserli hastaların %20'si ile %60'ı arasında bir oranda bulunduğu saptanmıştır (Engin ve Özkan 2003, Wittekindt vd 2012, Maier vd 2013, Quintero vd 2013).

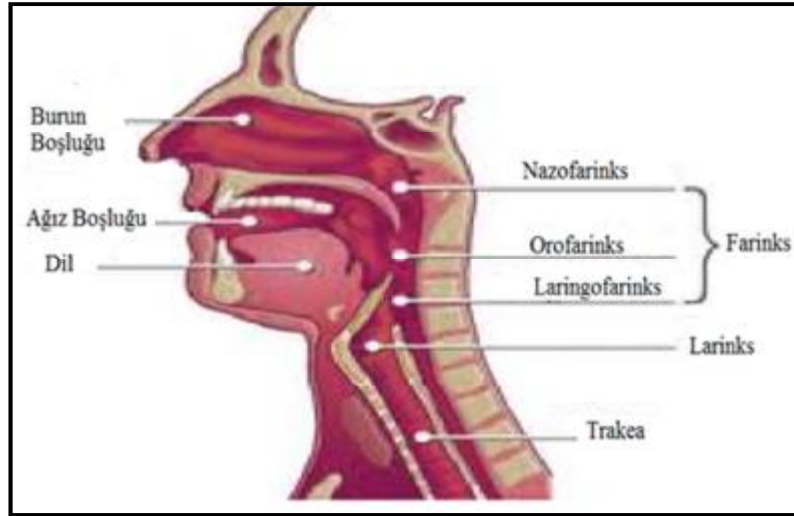
### **2.1.2.4. Diğer nedenler**

Baş ve boyun kanserlerine zemin hazırlayan diğer nedenler arasında artmış yaş, güneş ışınlarına uzun süre maruziyet, diyetle fazla yağ tüketimi ve ağırlıklı olarak yağda kızarmış yiyeceklerle beslenme, gastroözefageal reflü, radyasyon ve meslek (asbest, silika ve pamuk tozlarına maruziyet, kağıt, deri, lastik, tekstil, mobilya ve metal endüstrisi çalışanları gibi) gelmektedir (Gustavsson vd 1998, Engin ve Özkan 2003, Purdue vd 2006).



### 2.1.3. Bölgeye ait kanser türleri

Baş ve boyun bölgesi tümörlerinin görüldüğü bölgeler Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Baş ve boyun bölgesinde kanser riski olan bölgeler

#### 2.1.3.1. Oral kavite, nazal kavite ve paranasal sinüs kanserleri

Oral kavite kanserleri etiolojisinde, genetik faktörlerin yanında, kötü ağız hijyeni, güneşe ve soğuğa uzun süre maruz kalınan işlerle uğraşmak (dudak kanserleri için), dental travmalar ve tekrarlayan diş protezi travmaları, tütün vb. madde çiğneme alışkanlığı, sigara ve alkol tüketimi önemli rol oynayan temel faktörlerdir. Çoğu vakada gözlenen histolojik tipin skuamoz hücreli karsinomlar olduğu bildirilmiştir (Abraham vd 2009).

Diğer bölgelere göre paranasal sinüslerin malign tümörleri daha nadir görülmektedir. Tüm kanserlerin %0,3'ünü ve baş ve boyundaki kanserlerin de %3'ünü burun ve paranasal sinüs kanserleri oluşturmaktadır (Karcı 2003).

#### 2.1.3.2. Orofarinks ve nazofarinks kanserleri

Orofarinkste, en çok gözlenen tip skuamoz hücreli karsinomlardır. Tümörlerin etiolojisinde tütün kullanımı, en belirgin faktör olarak öne çıkar. Erkeklerde, kadınlara göre daha sık görülür. Bazı hastalarda, tonsil kanserleri human papilloma virüs ile ilişkili bulunmuştur (Kızılkaya 2003).

Nazofarinks kanserleri (NFK), dünyanın çoğu bölgesinde 100.000'de 1 insidansa sahip nadir görülen bir kanser türüdür ancak Kuzey Afrika, Güneydoğu Asya ve Çin gibi uzak doğu ülkelerinde ve Kuzey Kanada ve Grönland'da yaşayan eskimolarda nispeten daha sık görülür. Epstein-Barr virüs, NFK ile yakından ilişkili bulunmuştur. Bu ilişki, serolojik çalışmalar ve tümör örneklerinde saptanan viral genom ile açıklanmaktadır. Diyetle alınan tuzlanmış et ve genetik yatkınlık diğer önemli risk faktörleridir. Tütün ve alkolün, NFK için vakaların ufak bir bölümü dışında risk faktörü olmadığı belirtilmiştir. Tirozin kinaz reseptör ailesinden c-erb B2 geninin aşırı ekspresyonu diğer baş ve boyun karsinomlarında görülmez iken NFK'da bu protein düzeyinin aşırı artışının patogeneizde önemli rolü olduğu düşünülür. Çoğu vakada gözlenen histolojik tipin skuamoz hücreli karsinomlar olduğu bildirilmiştir (Altun vd 1998, Demiral 2003, Abraham vd 2009).

### **2.1.3.3. Larinks kanserleri**

Larinks kanseri, sigara içenlerde sık görülen bir malignitedir. Skuamoz hücreli karsinomlar, larinksin en sık (%95 oranında) görülen malign tümörleridir. Tüm kanserler içerisindeki payı ise, yaklaşık %1,1 civarındadır (WEB\_1 2014). Hastaların çoğu 50 yaşın üzerindedir. Erkeklerde sigara alışkanlığı kadınlara göre daha fazla olduğundan hastalık, erkeklerde kadınlara göre birkaç kat daha fazla görülür. Sigara dışında asbest tozlarına maruziyet, aşırı alkol tüketimi, ağır metallerle maruziyet ile odun ve kömür tozları, diğer etiyojik faktörlerdir (Engin ve Özkan 2003, Karcı 2003).

### **2.1.3.4. Tükürük ve tiroid bezlerinde oluşan kanserler**

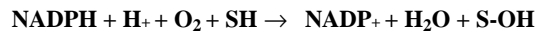
Tüm baş ve boyun tümörleri içerisinde %3-4'lük paya sahip olan tükürük bezi tümörlerinin en sık izlendiği yaşlar 30 ile 50 yaşlar arasındadır. Tiroid kanseri, en sık görülen endokrin tümör olmakla birlikte tüm tiroid bezi hastalıkları içerisinde az bir yer tutar.

### **2.1.3.5. Kulak ve temporal kemik kanserleri**

Kulak kanserleri, epitel kökenlidir ve çok nadir görülür. Güneşin zararlı ışınlarına maruziyet nedeniyle en sık görülen malign tümörler, bazal hücreli ve skuamoz hücreli karsinomlardır (Tezel 2003). Tüm temporal bölge tümörlerinin %86'sını skuamoz hücreli karsinom oluşturur (Kızılkaya 2003).

## 2.2. ADH, CYP2E1 ve ALDH2 Enzimleri Hakkında Genel Bilgiler

Vücudumuzda ksenobiyotik metabolizması, faz I ve faz II enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Faz I reaksiyonları çok büyük oranda sitokrom P450 enzimleri (CYP450) ile gerçekleşmektedir. Bunlar, insan olgun eritrosit ve iskelet kası hücreleri dışında tüm hücre tiplerinde bulunan, hem içeren ve 400 ila 530 arasında aminoasitten meydana gelen hemoproteinlerdir. Hücrede ağırlıklı olarak endoplazmik retikulumda veya iç mitokondri zarında bulunurlar. Enzimin aktif noktası  $Fe^{+3}$  iyonudur (Özerol 1996). CYP450 enzimleri ile katalizlenen genel reaksiyon şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



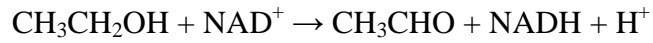
Sitokrom P450 enzimleri, çok sayıda enzim ve bunların izozimlerinden oluşan geniş bir enzim süperfamilyası oluşturur. Bu enzimlerin isimlendirilmesinde CYP, sitokrom P450'yi, onu izleyen sayı, enzimin familya numarasını, sonra gelen harf alt familya numarasını daha sonraki sayı ise bu alt familya içindeki bireysel enzim numarasını gösterir. Eğer familyanın tek bir üyesi bulunuyor ise familya numarasından sonra başka bir açıklayıcı işaret bulunmaz. İnsanlarda günümüze değin bu enzim ailesinin 18 familya ve 43 alt familyadan oluşan 57 ayrı enzim çeşidinin tanımlaması yapılmıştır (WEB\_2 2014).

CYP2E1, ADH ve ALDH enzimleri, alkol metabolizmasından sorumlu başlıca enzimlerdir. Enzim polimorfizmleri, ilaç yanıtında kişiden kişiye değişiklikler görülmesine yol açtığı gibi bazı kanserlerin oluşmasına da zemin hazırlayabilmektedir. Bu nedenle bu polimorfizmlerin fenotip karakteri üzerindeki etkilerinin araştırılması önem arz etmektedir.

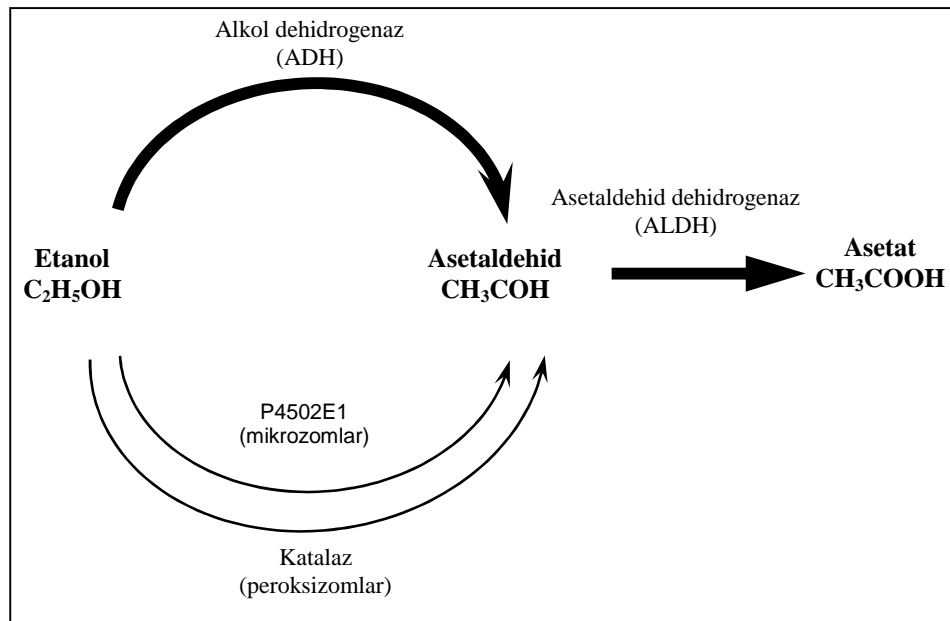
### 2.2.1. ADH fizyolojik fonksiyonları ve polimorfizmleri

Alkol, ADH ve CYP2E1 tarafından oksidasyonla asetaldehide, asetaldehid ise ALDH tarafından asetata dönüştürülmektedir. İnsanlarda ADH'nin en az yedi farklı gen tarafından kodlanmış dimerler halinde bulunan farklı formları vardır. İnsanlarda bunlar içerisinde miktar ve aktivite olarak en fazla olan form ADH1'dir. En yoğun olarak karaciğerde bulunan ADH1; *ADH1A*, *ADH1B* ve *ADH1C* genleri tarafından kodlanan  $\alpha$ ,

$\beta$  ve  $\delta$  alt ünitelerinden oluşur. ADH tarafından gerçekleşen etanol oksidasyon reaksiyonu aşağıdaki şekilde yürür (Sultatos vd 2004).



*ADH* ve *ALDH* genleri için gözlenen polimorfizmler, bireyler arasındaki alkol metabolizma hızındaki farklılığı ve akut alkol alımı sonrası gözlenen advers reaksiyonları açıklar (Nussbaum vd 2005). *ALDH2*\*2/\*2 homozigotlarda serum aldehid düzeyleri *ALDH2*\*1/\*1 homozigot bireylere göre 13 kat, heterozigot bireylerde ise *ALDH2*\*1/\*1 homozigot bireylere göre 4 kat fazla olmaktadır (Hiyama vd 2008). Güncel bir derlemede Kafkas ırklarında *ADH1C* enzimine ait *ADH1C*\*1/\*1 homozigot genotipi taşıyan bireylerin skuamoz hücreli baş ve boyun kanserine yakalanma riskinin taşımayanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. *ADH1B* (rs1229984), *ADH7* (rs1573496) ve *ADH1C* (rs698) polimorfizmlerinin de baş ve boyun kanserine yakalanma riskinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Cadoni vd 2012). Daha önce Denizli ve yöresinde yapılan bir çalışmada *ADH1C*\*1 alelini taşıyan bireylerde baş boyun kanseri riskinin arttığı bildirilmiştir (Kortunay vd 2010). Etanol ve asetaldehidin oksidatif metabolizması ait şema Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2** Etanol ve asetaldehidin oksidatif metabolizması

### 2.2.2. CYP2E1 fizyolojik fonksiyonları ve polimorfizmleri

İnsan CYP2E1 enzimini kodlayan gen, 10. kromozomda (10q24.3 bölgesinde) yerleşmiştir (Cury vd 2012). CYP2E1 alkol, endüstriyel kimyasallar, sigara dumanı, ilaçlar ve diğer bazı kimyasal maddelerin biyotransformasyonunda rol oynar. CYP2E1'e ait substrat, indükleyici ve inhibitörler Tablo 2.3'de, polimorfizmleri ise Tablo 2.4'de gösterilmiştir (McBride vd 1987, Umeno vd 1988, Watanebe vd 1990, Persson vd 1993, Fairbrother 1998, Hu vd 1999). CYP2E1, en fazla karaciğerde bulunmakla birlikte akciğer, bronş dokusu, böbrekler, ince barsak, kolon, nazal mukoza, plasenta ve lenfositlerde de varlığı gösterilmiştir (Neafsey vd 2009). *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi PstI ve RsaI polimorfizmlerinde c2 aleli taşıyan bireylerin azalmış enzim aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Hiyama vd 2008, Cadoni vd 2012). Bu bireylerde CYP2E1 substratı olan maddeler yoğun miktarda alındığında geç metabolize edilmekte ve oluşan toksisiteye bağlı genetik materyalde hasar görülebilmektedir. DraI polimorfizminde ise CC genotiplilerin, mutajenleri ve prokarsinojenleri daha fazla metabolize etme yeteneği olabileceği bildirilmiştir (Tang vd 2010). DraI polimorfizmi için mutant genotiplilerde faz I reaksiyonları sonucu normale göre daha yüksek miktarda oluşan daha aktif ara bileşikler nedeniyle kanser riskinin artma ihtimali mümkündür.

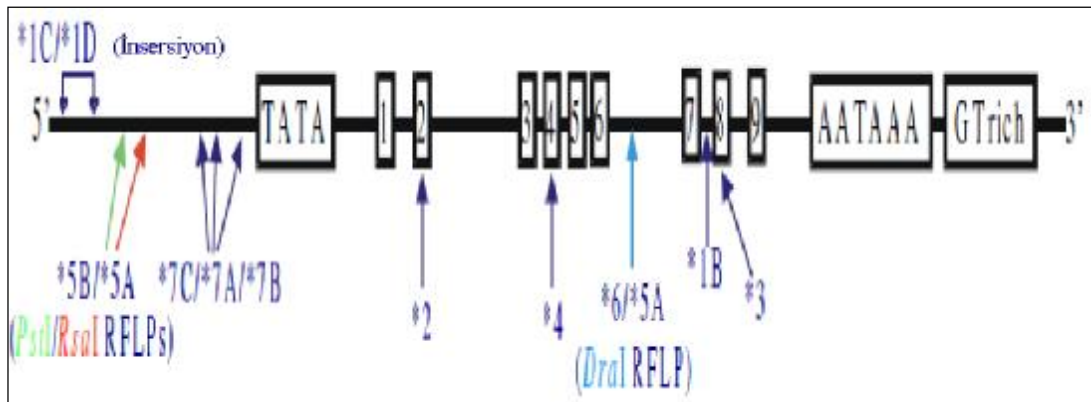
**Tablo 2.3** CYP2E1 enzimi substrat, indükleyici ve inhibitörleri (Özerol 1996, WEB\_2 2014).

İndükleyiciler		Substratlar		İnhibitörler
Etanol, Açlık, Diyabet, Aseton, Ketonlar, Diyet lipidleri	Piridin, İzoniazid, Pirazol, Eter, Benzen, İzopropanol	Etanol, Aseton, Benzen, Kloroform, Anilin, Pridin, Fenol, Stiren, CCl <sub>4</sub> , Alkanlar, Vinilklorür	İzoniazid, Dapson, Asetaminofen, Klorzaksazon, Halotan, İzofluran, Sevofluran, Enfluran, Eter, Azoksimetan, Nitrözaminler, Trikloroetilen, Dihaloetan	Disülfiram, Diallil sülfid, Diallil sulfon, Klormetiazol, Dietilditiyokarbamat, İzotiyosiyanat, 4-metil-pirazol

**Tablo 2.4** CYP2E1 polimorfizmleri.

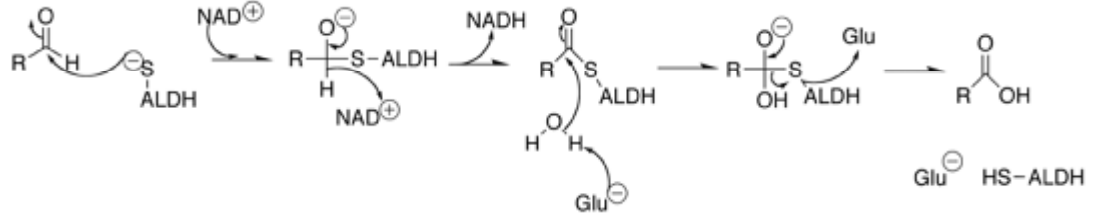
Alel	Protein	Nükleotid değişikliği	RFLP	Etki	Enzim aktivitesi		Kaynaklar	
					İn vivo	İn vitro		
<i>CYP2E1</i> *1A	CYP2E1.1	Yok				Normal	Normal	Umeno vd 1988
<i>CYP2E1</i> *1B	CYP2E1.1	9896C>G	TaqI-					McBride vd 1987
<i>CYP2E1</i> *1C	CYP2E1.1	5'- Uç bölgesinde 6 tekrar						Hu vd 1999
<i>CYP2E1</i> *1D	CYP2E1.1	5'- Uç bölgesinde 8 tekrar	DraI ve XbaI			Obezlerde ve alkol kullananlarda artmış aktivite		Hu vd 1999
<i>CYP2E1</i> *2	CYP2E1.2	1132G>A		R76H			Azalmış	Hu vd 1999
<i>CYP2E1</i> *3	CYP2E1.3	10023G>A		V389I			Normal	Hu vd 1999
<i>CYP2E1</i> *4	CYP2E1.4	4768G>A		V179I			Normal	Fairbrother vd 1998
<i>CYP2E1</i> *5A	CYP2E1.1	-1293G>C; -1053C>T; 7632T>A	PstI+ RsaI- Dra-					Persson vd 1993, Watanebe vd 1990
<i>CYP2E1</i> *5B	CYP2E1.1	-1293G>C; -1053C>T	PstI+ RsaI-					Watanebe vd 1990
<i>CYP2E1</i> *6	CYP2E1.1	7632T>A	DraI					Persson vd 1993
<i>CYP2E1</i> *7A	CYP2E1.1	-333T>A						Fairbrother vd 1998
<i>CYP2E1</i> *7B	CYP2E1.1	-71G>T; -333T>A						Fairbrother vd 1998
<i>CYP2E1</i> *7C	CYP2E1.1	-333T>A; -352A>G						Fairbrother vd 1998

Bir olgu-kontrol grubu çalışmasında CYP2E1 RsaI polimorfizmi için c2 mutant alel frekansında ve DraI C mutant alel frekansında baş ve boyun kanseri için risk artışı olduğu saptanmıştır (Bouchardy vd 2000). Kafkas ırkında yapılan başka bir çalışmada CYP2E1 DraI C mutant alel frekansında baş ve boyun kanseri için istatistiksel olarak anlamlı risk artışı bulunduğu bildirilmiştir (Lucas vd 1996). CYP2E1 PstI, RsaI ve DraI polimorfizmleri ile baş ve boyun kanseri ilişkisi araştırmalarının derlendiği meta-analiz çalışmalarında baş ve boyun kanseri riskinin özellikle Asyalılarda arttığı gösterilmiştir (Lu vd 2010, Tang vd 2010, Niu vd 2012). Kafkas ırklarında CYP2E1 polimorfizmleri ile baş ve boyun kanseri riski ilişkisi açısından çelişkili sonuçlar söz konusudur. Şekil 2.3'de *CYP2E1* geni üzerindeki polimorfizmlerin bölgeleri şematik olarak gösterilmiştir.

**Şekil 2.3** CYP2E1 polimorfizm bölgelerinin şematik gösterimi

### 2.2.3. ALDH2 fizyolojik fonksiyonları ve polimorfizmleri

ADH ve ALDH aktivitelerinin değişmesi, oluşan asetaldehid miktarını etkilemekte, artmış asetaldehid maruziyeti ise baş boyun kanserleri riskini artırıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli deneysel hayvan çalışmaları ile de asetaldehidin karsinojenitesi gösterilmiştir (Seitz ve Stickel 2007). ALDH üzerinden ilerleyen asetaldehid metabolizasyonu aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



Günümüze kadar, insanlarda 12 farklı ALDH tanımlanmıştır. Bunlardan mitokondriyal ALDH2, en önemlilerinden biridir. ALDH2 enzimi 4 alt birimden oluşur ve bu alt birimlerden herhangi biri defektif ise enzim inaktiftir (Crabb vd 1989). ALDH2 eksikliği olan bireyler alkol aldıklarında başlangıçta kanda asetaldehid birikerek yüzde kızarmaya neden olur. ALDH eksikliği otozomal dominant kalıtım gösterir. Çinliler’de görülme frekansı %45'lere ulaşırken siyahlarda ve beyazlarda gözlenmez. Bu nedenle uzak doğulular asetaldehidi daha yavaş yıkarlar.

ALDH2 genindeki polimorfizmler Tablo 2.5’de sunulmuştur (Crabb vd 1989, Tamakoshi vd 2003). *ALDH2* geninin 1510 no’lu pozisyonunda G/A polimorfizmi tek nükleotid değişikliğine (Glu487Liz) neden olur. Bu polimorfizmde 487Glu (*ALDH2\*1*), tam enzim aktivitesine sahipken, 487Liz aleli (*ALDH2\*2*), enzim aktivitesi göstermez. Bu nedenle 487Liz/Liz genotipi taşıyanların genellikle asetaldehid detoksifikasyonunun bozulması nedeniyle alkole toleransı yoktur. Uzakdoğu ırklarında sık görülen *ALDH2\*2* aleli, bu toplumlarda yapılan geniş çaplı meta analiz çalışmalarına göre baş ve boyun kanserine yakınlıkla ilişkili bulunmuştur (Hiyama vd 2008). Ancak, araştırma popülasyonumuzunda içinde bulunduğu Kafkas ırklarında son derece nadir görülmekte ve baş ve boyun kanseri ile ilişkili bulunmamaktadır (Goedde vd 1992, Cichoz-Lach vd 2008, Ahn vd 2009).

**Tablo 2.5** Aldehid dehidrojenaz 2 enzimi polimorfizmleri

Alel	Nükleotid değişikliği	Etki	Kromozom yerleşimi
<i>ALDH2*1</i>		Yabani tip	12q24.2
<i>ALDH2*2</i>	1510G>A	Lizin <sup>487</sup>	
<i>ALDH2*3</i>	1486G>A	Lizin <sup>479</sup>	
<i>ALDH2*4</i>	1464 G>A		

### 2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tekniği (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) yöntemi; bir organizmaya ait normal ya da parçalanmış DNA ya da RNA'nın *in vitro* ortamda çoğaltılarak genetik farklılıkların incelenmesine olanak veren bir metod'dur. Bilim dünyasında moleküler biyoloji, adli tıp, prenatal tanı ve arkeolojiye kadar uzanan geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır (Solak vd 2000).

PCR metodu ile 1 µg'dan daha az DNA örneğinin istenilen miktarda çoğaltılarak DNA analizinin saatlerle ifade edilen süreler içerisinde yapılması mümkündür. Ayrıca bu yöntemde DNA amplifikasyonu belirli bir noktada amplifikasyon durdurulduğunda reaksiyonun devam etmediğinden emin olunmaktadır.

#### 2.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonunun oluşum mekanizması

Reaksiyon bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması prensibine dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin kendilerine özgü hedef dizilere bağlanması ise daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar ve bu sayede kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur (Temizkan ve Arda 2007).

Bir PCR döngüsü üç evreden oluşmaktadır. Bunlar sırası ile denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) evreleridir.

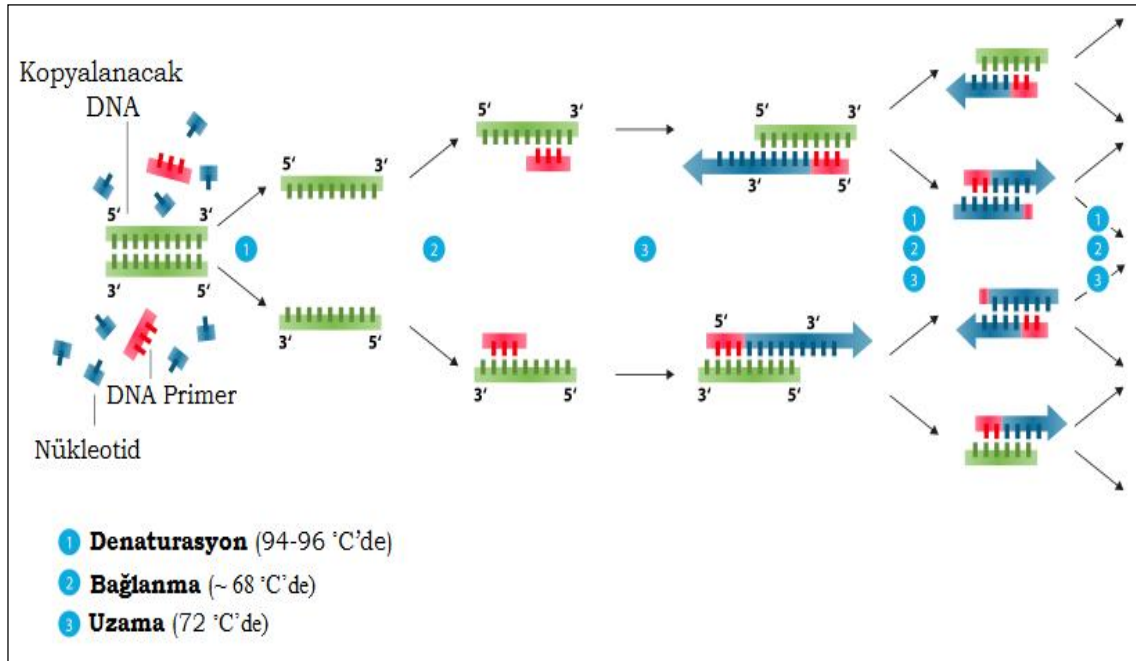
1- DNA'nın denatürasyonu: Bu aşamada çoğaltılacak çift sarmal DNA; sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarını ayırmak üzere denatüre edilerek tek sarmal haline



getirilir. DNA sarmallarının birbirinden ayrılması için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler olmakla birlikte 95-100 °C'ye kadar ısıtmak uygulanabilecek en basit ve ekonomik yöntemdir. Ancak PCR sırasında genellikle en etkin denatürasyon sıcaklığı 92-95 °C'dir (Solak vd 2000).

2- Primerlerin bağlanması (annealing): Bu evrede primer adı verilen ve çoğaltılması istenen DNA için spesifik olan sentetik oligonükleotid; ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisini tamamlayıcı olan nükleotid dizisi ile bağlanır. Primerler, hedef DNA sarmalının amplifikasyonunu sağlamak için kullanılırlar. Primerler, minimum 17-19 nükleotidden oluşmuş oligomerlerdir. Primerlerin bağlanması aşamasında deney ortamının ısı 40-60 °C'ye düşürülür.

3- Primerlerin uzatılması (extension) ve amplifikasyon: Primerlerin bağlanması aşaması tamamlandıktan sonra primer, hibridleştiği tek sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil olan ve *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Nükleotidleri orijinal DNA sarmalına tamamlayıcı biçimde primere ekler ve uzatır. Oluşan yeni DNA sarmalları bir sonraki döngüde primerler için kalıp olarak rol oynarlar. Primerlerin uzatılması aşamasında 70-75 °C civarında ısı uygulanır. 72 °C'de nükleotid eşleşme hızı; tampon, pH, tuz konsantrasyonu ve DNA kalıbının yapısına bağlı olarak saniyede 35-100 nükleotid olarak gerçekleşir. 72 °C'de bir dakikalık uzama süresi 2 kilobayt (kb) uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için genelde yeterlidir. PCR reaksiyonunun işleyişine ait şema Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4 PCR reaksiyonunun işleyişine ait şema (WEB\_3 2014)

PCR uygulamasında bir döngü üç evreden oluşur. Bir döngü 3-5 dakika sürer ve 20-40 kez tekrarlanır. Her döngü sonunda DNA miktarı iki katına çıkar. Döngü sayısı "n" olarak kabul edilirse " $2^n$ " çoğaltılmış DNA materyali miktarını verir. PCR işlemi için öncelikle doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyaç bulunmaktadır. Yöntemin son derece hassas olması nedeniyle çok düşük miktarlardaki kontaminasyon bile yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. PCR çalışmalarında diğer bir dezavantaj ise, her primer çiftinin kendine özgü bağlanma ve uzama koşulları (ısı, döngü uzunluğu, primer yoğunluğu,  $Mg^{+2}$  konsantrasyonu, enzim ve DNA miktarı değişiklikleri) olmasıdır (Solak vd 2000).

### 2.3.2. PCR'ın Temel Bileşenleri

PCR'nin temel bileşenleri, kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP) karışımı, tampon ve  $MgCl_2$ 'dir.

#### 2.3.2.1. Kalıp DNA

PCR yönteminde insan genomik DNA'sı kullanılabilirdiği gibi, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir. PCR'da kalıp olarak tek ya da çift iplikli DNA'nın yanı sıra RNA kullanılması da mümkündür.

### 2.3.2.2. Polimerazlar ve Primerler

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğe tamamlayıcı bir DNA ipliği meydana getirmek üzere, orijinal iplikteki baz bilgisini kullanarak dNTP'lerden uzun polinükleotid zinciri sentezinde rol oynarlar. Bu enzimler, sentezi başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan primerlere gerek duyarlar. Sentezin yönü 5' uçtan 3' uca doğru olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu gerçekleşir. Etkinliğine ve büyük DNA ürünlerini çoğaltma yeteneğine göre değişik enzimler seçilebilir.

Primerler, hedef dizinin her iki ucuna uyan oligonükleotidlerdir. Bu iki oligonükleotidden biri, çift zincirli bir DNA molekülünün zincirlerinden birinin ucundaki hedef diziye, diğeryse, diğer uçtaki diziye tamamlayıcı olarak uyması için tasarlanmıştır (Baykal vd 1996).

### 2.3.2.3. Deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP)

Deoksiribonükleotid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dSTP) saflık oranı yüksek tek tek veya dörtlü karışım halinde bulunurlar. Taq DNA polimeraz  $\mu\text{M}$  ile ifade edilen düşük dNTP konsantrasyonlarında kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR, 100  $\mu\text{M}$  dNTP konsantrasyonu ile gerçekleştirilir (Temizkan ve Arda 2007).

### 2.3.2.4. Tamponlar ve $\text{MgCl}_2$

Tampon çözeltiler PCR'da ortam pH'ını ayarlamak için kullanılır. Tampon çözeltisinin içeriğindeki Tris-Cl, pH'yı oda sıcaklığında 8,3-8,8 aralığında tutar. 72°C'de sıcaklıkta pH 7,2'ye kadar düşer. Polimeraz enzimlerinin aktivitelerini gösterebilmeleri için reaksiyon ortamında katyon bulunmalıdır. Bu amaçla genellikle  $\text{Mg}^{+2}$ , 1-1,5 mM aralığında konsantrasyonlarda kullanılır. Düşük  $\text{Mg}^{+2}$  ürün oluşumunda azalmaya yüksek konsantrasyonlar ise spesifik olmayan ürün artışına yol açar. Standart PCR tamponu, 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl ve 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$  içerir (Akar vd 1999, Temizkan ve Arda 2007).

### **2.3.2.5. PCR inhibitörleri**

DNA izolasyonu için en sık kullanılan materyal kandır. Kanın pıhtılaşmasını önlemek için kullanılan heparin potansiyel bir PCR inhibitörüdür. Bunun dışında kanda bulunan porfirin gibi diğer maddeler de PCR için kuvvetli inhibitör etki gösterirler. Bu nedenle DNA izolasyonu sırasında lizis ve santrifüjleme aşamalarında uzaklaştırılırlar. Taq DNA polimeraz, protein yıkımına duyarlı olduğu için proteinleri parçalayan proteinaz K enzimi de ortamdan uzaklaştırılmalı ya da inhibe edilmelidir. 95 °C’de gerçekleştirilen denatürasyon bu inhibisyon için yeterli olur. Ardı ardına yapılan santrifüj işlemleri DNA’nın sıvı fazda kalmasını sağlarken, proteazı da fenol fazına ayırır. Kalan fenol, kloroform: izoamil alkol veya eter ekstraksiyonu ya da DNA’nın etanol ile çöktürülmesi ile uzaklaştırılır (Temizkan ve Arda 2007).

### **2.4. Elektroforez**

Ortamda çözülmüş olarak bulunan yüklü moleküllerin elektrik alanı içerisinde elektrik yüklerinin kitlelerine oranıyla belirlenen hızlarda alan içerisindeki dağılımının izlenmesi tekniğine dayanan yöntem elektroforez adı verilir. Analiz edilecek numune destek ortamı vazifesi gören jellere uygulanır. İşlem, içerisinde uygun bir tampon bulunan elektroforez aygıtına yerleştirilerek yapılır. Numune, jelin üzerine nokta şeklinde veya ince bir bant olarak uygulanır.

Moleküllerin jel üzerindeki hareketi moleküllerin yükü, boyutu, biçimi ve elektriksel alanın şiddetine bağlıdır (Temizkan ve Arda 2007).

### **2.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP)**

DNA zinciri bölgeye özgü restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde, elektroforez ile gözlenebilen birbirinden farklı uzunluklarda parçalar oluşur. Bu parçalara restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (Restriction fragment length polymorphisms, RFLP) denir. Restriksiyon bölge polimorfizmleri, önceden var olan enzim kesme bölgesini değiştiren ya da yeni kesim bölgesi oluşturan tek baz değişimleridir (Başaran 2003).

### 3. MATERYAL VE METOT

Çalışmamız, Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik araştırmalar Etik Kurulu 05.08.2013 tarih ve 27530 sayılı onayı alınarak Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz (KBB) kliniğine başvuran baş ve boyun kanseri tanısı konulmuş hastalar üzerinde yapıldı. Araştırma popülasyonu, baş ve boyun tümörlü 79 bireylik olgu grubu (BBT) ve benzer epidemiyolojik özelliklere sahip 98 kişilik sağlıklı kontrol (SK) grubundan oluşturuldu. Olgu ve sağlıklı kontrol grupları çalışma hakkında bilgilendirildi ve olurları alındı. Bireylerden alınan 4-5 ml kan örnekleri %2'lik 1 ml EDTA içeren tüplere konulduktan sonra DNA'lar Pamukkale Üniversitesi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma-Uygulama Merkezinin 05.03.2002 tarih ve C02-001 numaralı kan örneklerinden DNA hazırlanması prosedürüne uygun olarak izole edildi. *CYP2E1* geninin C1019T, G-1259C ve T7678A tek nükleotid polimorfizmlerine (Single nucleotide polymorphisms-SNP) ve *ALDH2* geninin G1510A polimorfizmine ait gen bölgeleri PCR ve elektroforez yöntemleri kullanılarak incelendi ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Hasta ve kontrol gruplarının toplanması

73'ü larinks, 1'i maksiller, 3'ü oral kavite ve dil, 1'i dudak ve 1'i de sert damak tümörlü olan skuamoz hücreli baş ve boyun kanseri tanısı konulmuş 79 birey olgu grubuna alındı. Benzer epidemiyolojik özelliklere sahip 98 sağlıklı bireyden kontrol grubu oluşturuldu (Kortunay vd 2010 çalışmasında yer alan olgu ve kontrol grubu bireylere ait DNA örnekleri, gönüllü olur formlarına istinaden çalışmamızda da kullanılmıştır). Olgu ve kontrol gruplarında bulunan bireylerin hiçbirinde karaciğer ve böbrek hastalığı bulunmamaktaydı. Bireylerden alkol ve sigara kullanımları, mevcut hastalıkları, ailede kanser öyküleri ile ilgili bilgiler detaylı bir şekilde alınarak bilgi formlarına kaydedildi.

### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Ø Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-15R)
- Ø Mikropipet seti (Finnpipette)
- Ø Etüv (Nüve EN 055)
- Ø Vorteks (Heidolph)
- Ø Mikrosantrifüj (Beckman Coulter Microfuge 16)
- Ø Buzdolabı (Beko 5034 NF)
- Ø Derin dondurucu (Beko 7125)
- Ø Termal cykler (Peqlab Primus 25)
- Ø Hassas terazi (Ohaus)
- Ø Mikrodalga fırın (Beko MD-1610)
- Ø Manyetik karıştırıcı (Yellow Line MSH Basic)
- Ø Elektroforez tankı (Clever)
- Ø Elektroforez güç kaynağı (Wealtec Elite 300 Plus)
- Ø Jel görüntüleyici (Intas Science Imaging)

### 3.1.3. Kullanılan enzim ve kimyasal maddeler

- Ø 10×PCR Tamponu
- Ø 50-1000 bç DNA moleküler ağırlık markırı (m.a.m.)
- Ø Agaroz
- Ø Borik asit
- Ø dNTP mix
- Ø Doymuş fenol
- Ø EDTA
- Ø Etanol
- Ø Etidyum bromid
- Ø İzoamil alkol
- Ø Kloroform
- Ø MgCl<sub>2</sub>
- Ø Proteinaz K
- Ø Potasyum klorür
- Ø Sodyum dodesil sülfat

- Ø Sodyum klorür
- Ø Sodyum asetat
- Ø Steril saf su
- Ø Taq DNA polimeraz
- Ø Tris base
- Ø Tris-hidroklorid
  
- Ø Retikülosit tuz (Salin) çözeltisi
 

Sodyum klorür (NaCl)	686 mM
Potasyum klorür (KCl)	25 mM
Magnezyum klorür (MgCl <sub>2</sub> )	35 mM
  
- Ø Parçalayıcı çözelti ( Lizat hazırlama çözeltisi)
 

Amonyum klorür	155 mM
Potasyum bikarbonat	10 mM
Disodyum edta	0,1 mM
  
- Ø STE çözeltisi
 

Sodyum klorür	100 mM
Tris. HCl	10 mM (pH:8,0)
Disodyum edta	1 mM

#### 3.1.4. Primerler

- Ø CYP2E1 C-1019T/G-1259C polimorfizmleri için primer çifti:
 

Ön (Forward, F1) 5'- SSA GTS GAG TST ASA TTG TSA-3'

Ters (Reverse, R1) 5'-TTS ATT STG TST TST AAS TGG-3'
  
- Ø CYP2E1 T7678A polimorfizmi için primer çifti:
 

F1 5'-TSG TSA GTT SST GAA AGS AGG-3'

R1 5'-GAG STS TGA TGS AAG TAT SGS A-3'
  
- Ø ALDH2 G1510A polimorfizmi için primer grubu:
 

F1 5'-TGSTATGATGTGTTTGGAGSS-3'

R1 5'-SSASASTSASAGTTTTTSASTTS-3'

F2 5'-GGGSTGSAGGSATASASTA-3'

R2 5'-GGSTSSGAGSSASSA-3'

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Tam Kan Numunelerinden Genomik DNA'nın İzolasyonu

PCR tekniklerinin uygulanabilmesi ve sağlıklı sonuçlar alınabilmesi için öncelikle hücre DNA'sının yüksek saflıkta elde edilmesi gereklidir. DNA izolasyonu ard arda yürüyen üç basamakla gerçekleşir. Bunlar, sırasıyla; hücre parçalanması sonucu yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkması, ardından denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin birbirinden ayrılması ve DNA'nın çözünebilir duruma getirilmesi; son olarak da DNA'nın basit kimyasal ve enzimatik yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden temizlenmesi basamaklarından oluşmaktadır.

Bu aşamaların ardından farklı kaynaklı ya da farklı özellikteki DNA moleküllerinin ayrılması gerekmektedir. Bu amaçla kromatografik yöntemler de kullanılabilir olmakla beraber, jel elektroforezi daha yüksek ayırma gücü nedeniyle nükleik asitlerin analizinde kullanılan en yaygın yöntemdir (Temizkan ve Arda 2007).

Çalışmamızda DNA izolasyonu için kullanılan yöntemin esası, lökositlerde bulunan DNA dışındaki tüm yapıların bozularak parçalanması, yoğun bir tuz çözeltisi ile çöktürülmesi ve üstteki sıvı kısmında bulunan DNA'nın etanol yardımı ile yoğunlaşması sağlanarak izole edilmesine dayanır.

DNA izolasyonu için olgu ve kontrol gruplarından elde edilen 4-5 ml venöz kan örneklerinin her birinden 1 ml alındı. Üzerlerine 5 ml retikülosit tuz çözeltisi konularak hafifçe karıştırıldı. Santrifüjleme (3500 rpm'de 15 dakika) sonrası üstte yer alan süpernatant sıvı atıldı. Elde edilen çökelti, üç kez retikülosit tuz çözeltisi ile yıkandı ve her seferinde 15 dakika boyunca 3500 rpm'de santrifüjlendi.

Temiz 15 ml'lik santrifüj tüpleri içerisine aktarılan son çöktülerin üzerine 3'er ml soğuk parçalayıcı çözelti (lizat hazırlama çözeltisi) eklenerek en az 15 dakika berraklaşma sağlanana kadar derin dondurucuda bekletildi. Daha sonra tüpler 3500 rpm'de 15'er dakika santrifüjlenerek üst sıvılar atıldı. Çökelti üzerine 1 ml STE çözeltisi eklendi. Karıştırılarak bir kez daha 3500 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvılar atıldı. Elde edilen nükleer pellet çökeltiden kaybetmeksizin tüpler ters çevrilerek filtre kağıtları üzerinde 15'er dakika bekletildi. Daha sonra nükleer pelletler üzerine 1-2 ml STE çözeltisi eklenerek vortekste karıştırıldı. Üzerine ml'de 100 µg olacak şekilde Proteinaz-



K ve hacimce %1 oranında SDS eklenerek karıştırıldı. Tüpler oda ısısında bir gece boyunca ve ardından 37 °C sıcaklıkta 2-4 saat süre ile bekletildi. Tüplerin üzerine içlerindeki madde ile eşit miktarda doymuş fenol eklenerek karıştırıldı. Bu karışımlar 3000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Üstteki su fazı, temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Su fazı üzerine eşit miktarda fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklendi, karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek üstteki su fazları bir erlen içerisine alındı. Alınan su fazı üzerine hacminin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (pH:5) eklendi ve saf etanol ile 20 kat hacmine kadar çoğaltıldı. DNA çökünceye kadar karıştırıldı. Normal olarak ipliksi görünümde birkaç dakika içerisinde çökelen DNA otomatik pipet ucu yardımıyla Eppendorf tüpleri içerisine konuldu.

Eppendorf tüpü içerisinde bulunan DNA üzerine %70'lik etanol eklenerek karıştırıldı ve tekrar santrifüjlenerek etanol atıldı. Bu şekilde yıkanmış olan DNA, steril saf su yardımıyla çözüldü.

### 3.2.2. Genomik DNA'nın spektrofotometrik analizi

DNA numunelerinin konsantrasyonu ve saflığını belirlemek için 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerleri Eppendorf® spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. DNA molekülü, 260 nm'de azami absorpsiyonu verir. Bu dalga boyunda okunan değer, çift sarmallı DNA molekülünün yaklaşık 50 µg/ml konsantrasyonunda 1,0 optik yoğunluğa (O.Y.) sahip olması temel bilgisine dayanılarak numunedeki nükleik asit konsantrasyonunun hesaplanması esasına dayanır.

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{g/ml}) = \text{O.Y.}_{260 \text{ nm}} \times \text{Seyreltme faktörü}$$

260 nm ve 280 nm arasındaki O.Y. değerleri arasındaki oran ( $\text{O.Y.}_{260 \text{ nm}} / \text{O.Y.}_{280 \text{ nm}}$  oranı) nükleik asit saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA preparatlarında bu oran 1,8' dir. Daha yüksek veya düşük değerler, genellikle sırasıyla RNA, protein veya fenol kontaminasyonlarını gösterir. Protein veya fenol kontaminasyonu olmadan saf olarak DNA izolasyonu, çalışmamızın kritik basamaklarından biridir.

Spektrofotometrik yöntemlerle saflığı tayin edilen numunelerden  $\text{O.Y.}_{260 \text{ nm}} / \text{O.Y.}_{280 \text{ nm}}$  değeri 1,7'den aşağı ve 1,9'dan yukarı olan numuneler elendi ve yeniden izolasyon sürecine başlandı.

### 3.2.3. Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile saflık kontrolü

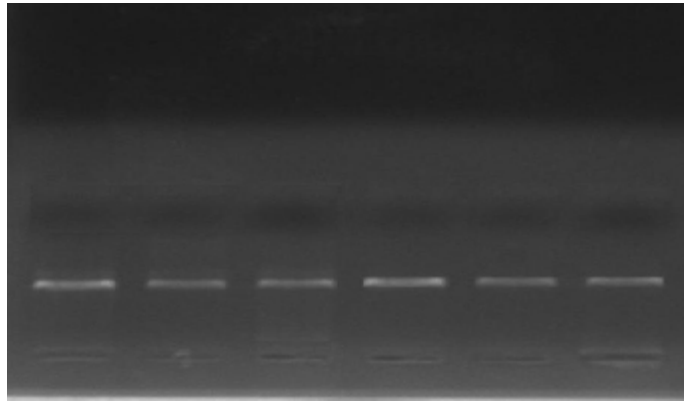
Saflık tayini için DNA numuneleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile de test edildi. Bu amaçla Wealtec® Elite 300 Plus model güç kaynağına bağlı Cleaver® marka yatay jel tepsili elektroforez kabı kullanıldı.

%2'lik agaroz jel hazırlamak için 0,6 gram toz agaroz hassas terazi ile tartıldı. Temiz bir erlene aktarıldı. Üzerine 30 ml 0,5X TBE (Tris-Borat-EDTA, pH8,3) tamponu eklendi. Erlen'in ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. Hafifçe karıştırıp Beko® MD-1610 mikrodalga fırına koyuldu. Aralıklarla kontrol ederek erlen içerisindeki agaroz kristallerinin eridiğinden emin olana kadar ortalama iki dakika ısıtıldı. Kristaller tamamen eriyip sulu fazın altında jel oluştuğunu görünce soğumaya bırakıldı. Heterojen soğumayı engellemek için doğrudan banko üzerinde soğumaya bırakılmadı. Solüsyon yaklaşık 60 °C'ye kadar soğuduğunda üzerine UV ışık altında bantların görülmesini sağlayan Etidyum bromür'den 3 µl ilave edildi ve karışım yavaşça çalkalandı. Bu işlemler devam ederken, diğer yandan elektroforez kabı, tepsisi ve jel tarakları önce distile su ile ardından %70'lik etanol ile yıkanıp temizlendi. Tepsinin kenarlarına kauçuk bariyerler geçirildi ve üzerinde bulunan bölmelere jel tarakları yerleştirildi.

Sıcak jel ve etidyum bromür karışımını içeren erlen, tepsinin 3-4 cm yukarisından tutularak kabın içerisine yavaşça döküldükten sonra eğer jel üzerinde oluşan hava kabarcığı var ise pipet ucu yardımıyla alınarak oda sıcaklığında 30-40 dakika boyunca soğumaya bırakıldı.

Sürenin sonunda jelin iyice katılaştığını gözlemledikten sonra elektroforez tepsisinin kenarlarındaki kauçuk bariyerler çıkarıldı. Tepsi, yaklaşık 350 ml civarında 0,5X TBE tamponu ile doldurduğumuz yatay elektroforez tankına jelin üzerindeki kuyular katot'a bakacak şekilde yerleştirildi. Jelin üzerindeki tarak yavaşça ve dikkatli bir şekilde kaldırıldı. Jelin üzerini 1-1,5 mm kaplayacak kadar bir miktar daha 0,5X TBE tamponu ilavesi yapıldı. Oluşan bir hava kabarcığı var ise pipet ucu yardımı ile alındı. DNA numunesi [5 µl (0,25- 0,5 ng)] ve 1 µl yükleme tamponu (loading buffer), mikropipet ile birkaç defa çekip bırakmak suretiyle iyice karıştırıldı. Karışım (6 µl'lik), mikropipet yardımı ile jelin üzerindeki kuyulardan birine yüklendi. Her bir DNA numunesi için aynı işlem tekrar edilerek jelin üzerindeki kuyulara sıra ile yüklendi. En son sırada bulunan kuyuya elektroforez sonucu oluşan bantların yerinin net olarak

gözlemlenmesini sağlayan 50-1000 baz çiftleri arasında belli aralıklarla kuvvetli bantlar veren DNA m.a.m. yüklendi. Elektroforez kabının kapağı kapatıldı. Güç kaynağının elektroforez kabına kablo bağlantıları yapıldı. Güç kaynağı 90 volt'a ayarlanarak numuneler elektroforezde 30 dakika boyunca yürütüldü. Sürenin sonunda jel UV ışığı altında bilgisayar destekli Intas® jel görüntüleme sistemi ile görüntülenip kayıt edildi. Jelin kuyularına yerleştirdiğimiz saf DNA, elektroforezde kuvvetli bir tek band şeklinde gözlenmektedir (Şekil 3.1). Elektroforez sonucunda jel üzerinde değişik bantlara ait leke ve izler bulunması DNA'nın bozunmaya uğradığını gösterir.



**Şekil 3.1** Elektroforezde DNA örneklerinin görünümü (%2' lik agaroz jel'de 90 volt'ta 30 dakika yürütülmüştür)

### 3.2.4. PCR işlemi

*CYP2E1* genine ait üç (C-1019T/G-1259C ve T7678A) ve *ALDH2* genine ait tek bölge (1510 nolu pozisyonda G/A değişimi) SNP'yi araştırmak için Peqlab® primus 25 model termal blok (thermo cycler) kullanıldı.

#### 3.2.4.1. C-1019T/G-1259C Tek Nükleotid Polimorfizmleri

5' bölgesine özgü olmayan bantlardan arındırılmış *CYP2E1* genine ait tek bir bant elde edebilmek için PCR'de değişik parametreler test edildi. Bu parametreler arasında, MgCl<sub>2</sub>'ün 1,0 ile 3,0 mM arasındaki konsantrasyonları, primer çiftlerinin 20 ile 100 pmol arasındaki konsantrasyonları ve kalıp DNA'nın 100, 200, 300 ve 500 ng gibi değişik konsantrasyonları ile çalışmaların yapılması yer almaktadır. C-1019T/G-1259C çoğaltma programında izlenen genel protokol Tablo 3.2'de, PCR ile çoğaltma

programında kullanılan bileşenlerin ideal hacim ve konsantrasyonları Tablo 3.3'de sunulmuştur.

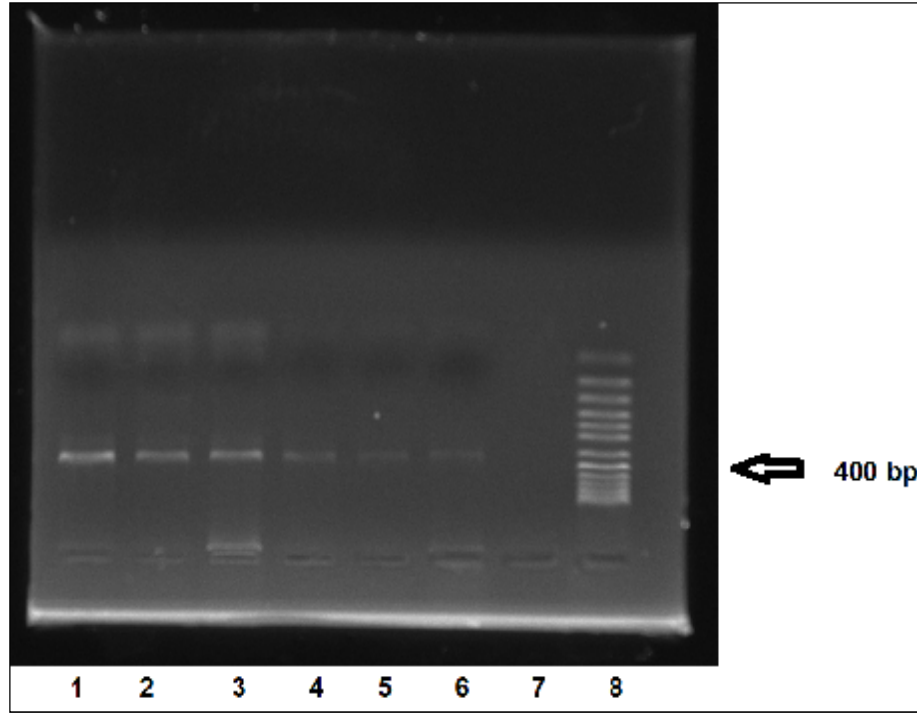
**Tablo 3.1** *CYP2E1* geni C-1019T/G-1259C tek nükleotid polimorfizmleri için PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol

<b>Denatürasyon</b>	94 °C	1 dk	35 döngü
<b>Tavlama</b>	55 °C	1 dk	
<b>Uzatma</b>	72 °C	1 dk	
<b>Final Uzatması</b>	72 °C	1 dk	

**Tablo 3.2** *CYP2E1* geni C-1019T/G-1259C polimorfizminde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için ideal hacim ve konsantrasyonları

<b>İçerik</b>	<b>Stok konsantrasyon</b>	<b>Eklenecek hacim</b>	<b>50 µl reaksiyon karışımındaki konsantrasyon</b>
Kalıp DNA	3 µl	3 µl	~4 ng/ µl
Tampon (Buffer)	10x	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP karışımı	10 mM	1 µl	200 µM
Ön primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Ters primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Taq DNA Polimeraz	5 U/L	1 µl	5 U
Steril su		50 µl'ye tamamlanır.	

PCR ürünleri sırasıyla 1'er µl yükleme tamponu ile (loading buffer) 3.2.3 bölümünde belirtildiği gibi karıştırılarak jelin kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 30 dakika yürütülmesinin ardından yapılan görüntülemelerde ~400 bp hizasında ilgili bölgeye ait tek bantlar gözlemlendi. Şekil 3.2'de PstI/RsaI PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü örneği sunulmuştur.



**Şekil 3.2** *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi C-1019T/G-1259C polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü. %2'lik jel, yüklendikten sonra 90 voltta 30 dakika yürütülmüştür. 1-6 numaralı hatlar PCR ürünleri 7 numaralı hat boş, 8 numaralı hat 50-1000 bp DNA m.a.m.'dir.

#### 3.2.4.2. T7678A tek nükleotid polimorfizmi

T7678A tek nükleotid polimorfizmini (*CYP2E1*\*6- rs6413432) belirlemek için, DraI endonükleaz enzimi kullanılır. *CYP2E1* geninin 997 nükleotitten oluşan intron 6 bölgesini, beklenen dışındaki özgün olmayan bantlardan arındırarak çoğaltma reaksiyonu sonucunda bölgeye ait tek bir bant elde etmek için değişik konsantrasyonlardaki parametreler denendi. *CYP2E1* geni intron 6 bölgesini çoğaltma programında izlenen genel protokol Tablo 3.4'de, PCR ile çoğaltma programında kullanılan bileşenlerin ideal hacim ve konsantrasyonları Tablo 3.5'de sunulmuştur.

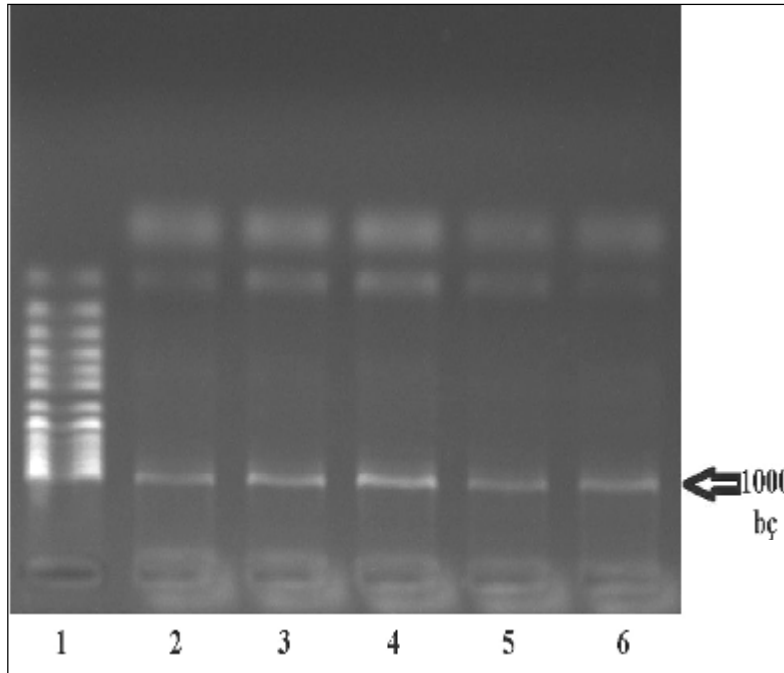
**Tablo 3.3** *CYP2E1* geni intron 6 bölgesi T7678A tek nükleotid polimorfizmi için PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol

<b>Denatürasyon</b>	94 °C	3 dk	35 döngü
<b>Tavlaştırma</b>	61 °C	1 dk	
<b>Uzatma</b>	72 °C	1 dk	
<b>Final Uzatması</b>	72 °C	1 dk	

**Tablo 3.4** *CYP2E1* geni T7678A polimorfizminde PCR için kullanılan bileşenlerin reaksiyon için kullanılan ideal hacim ve konsantrasyonları

İçerik	Stok konsantrasyon	Eklenecek hacim	50 µl reaksiyon karışımındaki konsantrasyon
Kalıp DNA	3 µl	3 µl	~4 ng/ µl
Çoğaltma tamponu (Buffer)	10x	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP karışımı	10 mM	1 µl	200 µM
Ön primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Ters primer	10 pmol/ µl	2 µl	20 pmol
Taq DNA Polimeraz	5 U/L	1 µl	5 U
Steril su		50 µl'ye tamamlanır.	

PCR ürünleri sırasıyla 1'er µl yükleme tamponu ile (loading buffer) 3.2.3'te belirtildiği gibi karıştırılarak jelin kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 30 dakika yürütülmesinin ardından yapılan görüntülemeye ~1000 bç hizasında ilgili bölgeye ait tek bantlar gözlemlendi. Şekil 3.3'de DraI PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü örneği sunulmuştur.



**Şekil 3.3** *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi T7678A polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü. %2'lik jel, yüklendikten sonra 90 voltta 30 dakika yürütülmüştür. 2-6 numaralı hatlar PCR ürünleri, 1 numaralı hat 50-1000 bç DNA m.a.m.'dir.

### 3.2.4.3. *ALDH2* Geni G1510A Tek Nükleotid Polimorfizmi

*ALDH2* geni 1510 nolu pozisyonda Guanin yerine Adenin tek nükleotid değişimi (G/A) (rs671) enzimin yapısında aminoasit değişimine (Glu487Liz) neden olur. Söz konusu polimorfizmin araştırılmasında kesim enzimleri kullanılarak yapılan PCR-RFLP yöntemi yerine nispeten daha yeni bir teknik olan multipleks-PCR adı verilen büyük bir gen bölgesindeki delesyon veya duplikasyonları hızlı bir şekilde tespiti olanak veren modifiye bir PCR yöntemi uygulandı. PCR protokolü, araştırılan diğer polimorfizmler'deki protokollere benzemekle beraber onlardan farklı olarak iki ön, iki adette ters primer kullanıldı. Bu primer çiftleri birbiri ile komşu olan bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan primer çiftleri olduğu için bu sayede polimorfizm olup olmadığı kesim reaksiyonu yapmaksızın tespit edildi. Şekil 3.4'te *ALDH2* enzimi 1510 numaralı pozisyon komşuluğunda bulunan bölgelerin nükleotid dizilimleri ve kullanılan primerlerin yerleşimleri gösterilmiştir.

...ASAGGGTSAASTGSTATGATGTGTTTGGAGSSSAGTSASSSTTTGGTGGSTASAAGATGTS  
 GGGGAGTGGSSGGGAGTTGGGSGAGTASGGGSGTGSAGGSATASASTGAAGTGAAAASTG  
 TGAGTGTGGGASSTGSTGGGGGSTSAGGGSSTGTTGGGGSTTGAGGGTSTGSTGGTGGST  
 SGGAGSSTGSTGGGGGATTGGGGTSTG..... .

**Şekil 3.4** *ALDH2* geni G1510A polimorfizminde kullanılan primerlerin yerleşim bölgeleri. Sarı renkle gösterilen bölge 1 numaralı ön primer (F1), kırmızı renkle gösterilen bölge 2 numaralı ön primer (F2), eflatun renkle gösterilen bölge 1 numaralı ters primer (R1), turkuaz renkle gösterilen bölge 2 numaralı ters primeri (R2) belirtmek için kullanılmıştır. Noktalar, o bölgelerde pek çok nükleotid olduğunu belirtmek için kullanılmıştır.

Çoğaltma reaksiyonunda beklenen dışındaki özgün olmayan bantlardan arındırarak bölgeye ait tek bir bant elde etmek için değişik konsantrasyonlardaki parametreler denendi. PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol Tablo 3.6'da, reaksiyonda kullanılan bileşenlerin ideal hacim ve konsantrasyonları Tablo 3.7'de sunulmuştur.

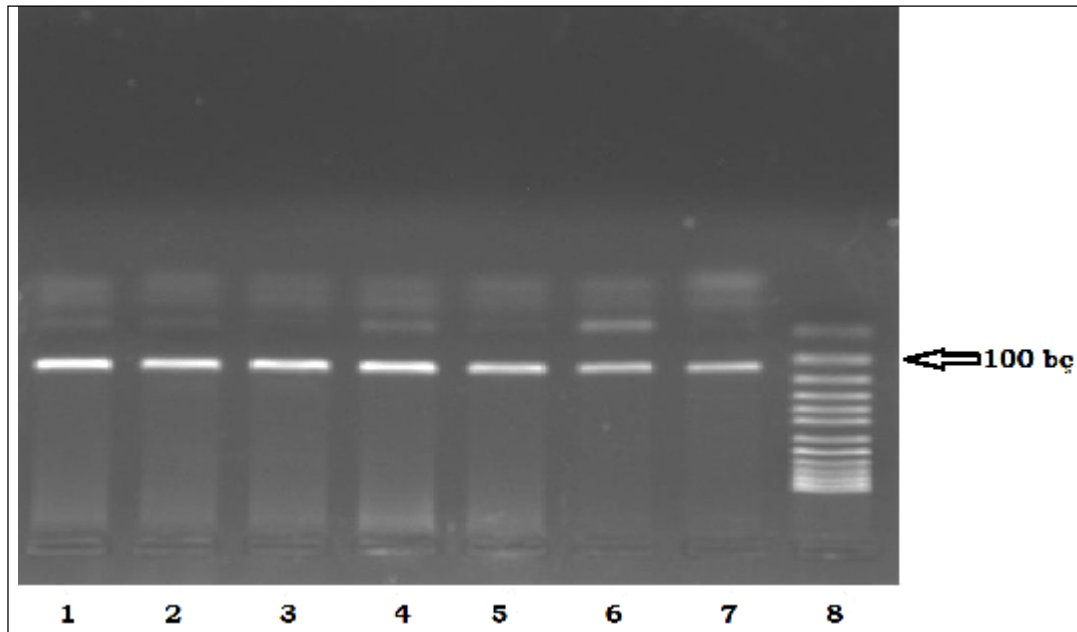
**Tablo 3.5** *ALDH2* geni G1510A tek nükleotid polimorfizmi için PCR ile çoğaltma programında izlenen genel protokol

<b>Denatürasyon</b>	95 °C	3 dk	35 döngü
<b>Tavlaştırma</b>	55 °C	0,5 dk	
<b>Uzatma</b>	72 °C	1 dk	
<b>Final uzatması</b>	63 °C	1 dk	

**Tablo 3.6** *ALDH2* geni G1510A tek nükleotid polimorfizminde PCR için kullanılan ideal koşullar

İçerik	Stok Konsantrasyon	Eklenecek Hacim	50 µl Reaksiyon Karışımındaki Konsantrasyon
Kalıp DNA	6 µl	6 µl	~8 ng/ µl
Tampon (Buffer)	10x	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4 µl	2 mM
dNTP karışımı	10 mM	1 µl	200 µM
Ön primerler	20 pmol/ µl	4 µl	40 pmol
Ters primerler	20 pmol/ µl	4 µl	40 pmol
Taq DNA Polimeraz	5 U/L	1 µl	5 U
Steril su		50 µl'ye tamamlanır.	

PCR ürünleri sırasıyla 1'er µl yükleme tamponu ile (loading buffer) 3.2.3'te belirtildiği gibi karıştırılarak jelin kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde 90 voltta 30 dakika yürütülmesinin ardından yapılan görüntülemeye ~100 bç hizasında ilgili bölgeye ait tek bantlar gözlemlendi. Şekil 3.5'de *ALDH2* PCR ürünlerinin elektroforez görüntüsü örneği sunulmuştur.



**Şekil 3.5** *ALDH2* geni G1510A tek nükleotid polimorfizmi için PCR reaksiyonu sonrası elektroforez görüntüsü. %2'lik jel, yüklendikten sonra 90 voltta 30 dakika yürütülmüştür. 1-7 numaralı hatlar PCR ürünleri, 8 numaralı hat 50-1000 bç DNA m.a.m.'dir.



### 3.3 *CYP2E1* geni PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

Hem intron 6 hem de 5' sınır bölgesine ait PCR ürünleri SNP'leri içerir. Bu polimorfizmleri RFLP yöntemi ile tespit etmek mümkündür. RFLP, tek baz değişikliklerinin belirlenmesine olanak veren bir tekniktir. Restriksiyon endonükleazlarla DNA'nın farklı büyüklükteki parçalara ayrılarak incelenmesi temeline dayanır. Her restriksiyon endonükleaz enzimi bir bölgedeki kendi tanıma bölgesine özgüdür. Enzim kendi tanıma bölgesini bulduğunda o bölgeyi keser. Kestiği için daha küçük uzunlukta oligonükleotid zincirleri oluşur. Kesime uğramış ve zincir uzunluğu değişmiş örnekler elektroforezde kesilmemiş olanlara göre farklı bantlar verirler. İlgili restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu bireyin genotipini belirlememizi sağlar. Tanıma bölgesi yabani tip (wild type) olan bir gen parçasında kesim yapan bir enzim kendine özgü bölgeyi kestiğinde bu durum ilgili kısımda mutasyon olmadığını gösterirken, kesim reaksiyonunun gerçekleşmemesi polimorfizm varlığına işaret eder. Ters olarak mutant alellerde kesim yapan restriksiyon endonükleaz enziminin bir PCR ürünüde kesim yapmaması, o bireyde mutasyon olmadığını ve bireyin genotipinin yabani tip olduğunu ortaya koyar. Her iki durumda *CYP2E1* SNP'lerinde gözlenir.

C-1019T, G-1259C ve T7678A SNP'leri genotipleme çalışmalarında sırasıyla RsaI, PstI ve DraI restriksiyon endonükleazlar kullanılmaktadır. Bu restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgeleri ve bunlara karşılık gelen SNP'ler Tablo 3.8'de verilmiştir.

**Tablo 3.7** *CYP2E1* geni tek nükleotid polimorfizmleri ve bunlara karşılık gelen restriksiyon enzimleri ile tanıma bölgeleri

SNP'nin bölgesi	SNP	Restriksiyon endonükleaz	Restriksiyon enziminin tanıma bölgesi
5' sınır	C-1019T	RsaI	5'...G T ↓ A C...3' 3'...C A ↑ T G...5'
	G-1259C	PstI	5'...C T G C A ↓ G...32 3'...G ↑ A C G T C...5'
İntron 6	T7678A	DraI	5'...T T T ↓ A A A...3' 3'...A A A ↑ T T T...5'

*CYP2E1* geninin PCR ile çoğaltılan 5' sınır bölgesi sırasıyla RsaI ve PstI restriksiyon endonükleazlar tarafından tanımlanabilen C-1019T ve G-1259C bölgeleri gibi iki adet SNP içeren bölgeye sahiptir. Şekil 3.5'de 5' sınır bölgesinin PCR ile çoğaltılmış bölgesini, primerlerin yerleşim yerlerini, her iki SNP ve ilgili restriksiyon endonükleaz

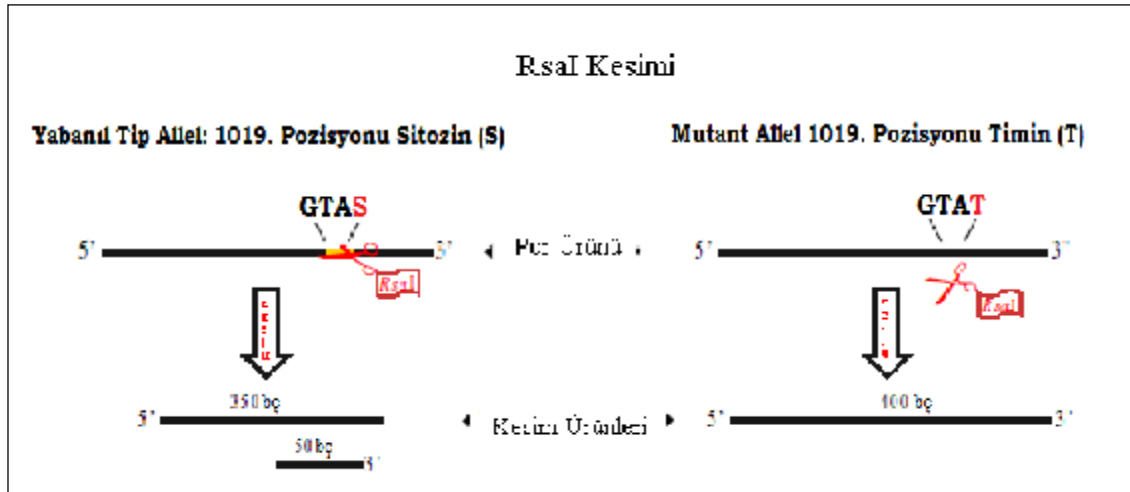
enzimlerinin tanıma bölgeleri gösterilmektedir. Genotipleme için, 5' sınır bölgesi PCR ürünleri, RsaI ve PstI enzimleri ile kesildi.

-1382 SASSSGTGAG **SSAGTSGAGT STASATTGTS A**GTTSTSASS TSGAGGGGTG SSAAAAASSA  
 -1322 GAG**GAAC**SA AAGGSSSTG AAGSSTSTGS SAGAGGSSAA SGSSSTTST TGGTTSAGGA  
 -1262 **GAGC**TGSAGT GTTAGGTGSA GSASAASSAA TGASTTGSTT ATGTGGSTAA TAAATTG TSA  
 -1202 AGAGAAAAAS TGGGTTAGAA TGSAATATAT AGTATGTAGT STSATTTTTG TATAAATASA  
 -1142 AGTATAGAAT GGSATAASTS AAAATSSASA AGTGATTTGG STGGATTGTA AATGASTTTT  
 -1082 ATTTTSTTSA TTTTSATSA TATTTTSTAT TATASATAAA GATTSATTGT TAATATAAAA  
 -1022 **GTAS**AAAATT GSAASSTATG AATTAAGAAS TTSTATATAT TG**SSAGTTAG AAGASAGAAT**  
 -962 **GAA**AAASATT STSTTSATTS TAA.....

**Şekil 3.6** PCR ile çoğaltılmış *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi C-1019T / G-1259C polimorfizmi içeren sekanslar. Sarı renkli bölgeler ön ve ters primerler, kırmızı renkli bölgeler SNP'nin olduğu nükleotidler, yeşille işaretlenmiş bölgeler ise restriksiyon endonükleazlar için tanıma bölgeleridir. Noktalar şeklinde gösterilen yerler o bölgelerde pek çok nükleotid olduğunu belirtmek için kullanılmıştır (Ulusoy 2004).

### 3.3.1 C-1019T tek nükleotid polimorfizminde RsaI endonükleaz kesimi

C-1019T SNP'sinde *CYP2E1* geninin 1019 numaralı nükleotidinde yabancı tip alelde Sitozin (S) bulunurken mutant alelde aynı pozisyonda Timin (T) bulunur. Yabancı tip alelin S taşıyan 1019 numaralı pozisyonunda PCR ürünü; Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterildiği üzere restriksiyon endonükleaz RsaI için bir tanıma bölgesi (5'- GTAC-3') içerir. RsaI ile kesim reaksiyonu 37 °C'de 24 saat boyunca sürdürülerek 400 bç'lik PCR ürünü etkin bir şekilde kesilir ve 350 bç ve 50 bç'lik iki parça meydana gelir. 1019. pozisyonda T içeren mutant alel de ise RsaI enziminin tanıyarak kesebileceği bir bölge bulunmadığı için reaksiyon süresinin sonunda 412 bç'lik kesilmemiş PCR ürününün kendisi elde edilir.



**Şekil 3.7** *CYP2E1* geni *RsaI* kesimi bant kalıpları için şematik gösterim.

Birey, homozigot yabancı tip ise bireye ait PCR ürünü *RsaI* enzimi ile aktif bir şekilde kesime uğrar ve elektroforez neticesinde 350 bç ve 50 bç'lik iki adet bant gözlenir. Homozigot mutant bireylerde ise enzim herhangi bir bölgeyi kesemediği için 400 bç'lik tek bir bant gözlenir. Heterozigotlarda ise kesilmemiş tek bir 400 bç'lik bant ile kesime uğramış alele ait 350 ve 50 bç'lik iki adet bant olmak üzere elektroforez sonrasında toplam üç bant gözlenir.

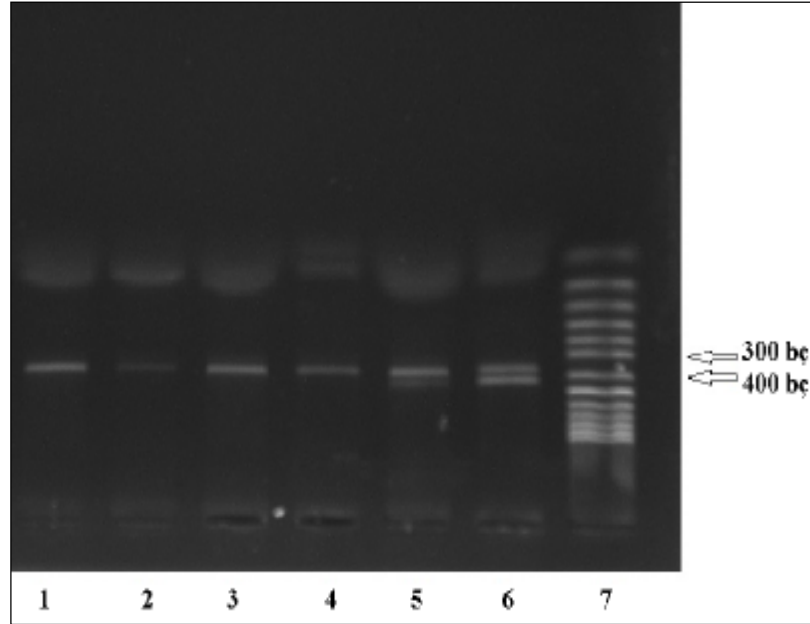
Çalışmamızda 10 µl PCR ürünü, üretici firmanın reaksiyona özgülü olarak önerdiği tampon çözelti içerisindeki 0,5 µl *RsaI* enzimi ile kesim işlemine sokuldu. Kesim reaksiyonu ortamda kesilmeden kalan ve genotipin yanlış değerlendirilmesine neden olabilecek hiçbir parça kalmaksızın ilgili tüm bölgelerin kesildiğinden emin olmak için 37 °C'de 24 saat süre ile devam ettirildi. *RsaI* kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları Tablo 3.9'da gösterilmiştir.

**Tablo 3.8** *RsaI* kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşen	Stok konsantrasyon	Eklenen hacim	Reaksiyon karışımındaki (30 µl) final konsantrasyon
PCR ürünü		10 µl	
<i>RsaI</i> enzimi	10 Ü/µl	0,5 µl	5 Ü
Tampon çözeltisi	10x	3 µl	1x
Steril su		16 µl	

Kesim ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek 90 voltta 30 dakika süre elektroforez yapıldı. Sonrasında yapılan görüntülemeye kesim ürününün verdiği bandın ya da bantların özelliğine göre bireyin genotipi tayin edildi. 350 ve 50 bç'de iki bant verenler

homozigot yabancı tip, 400-350 ve 50 bç'lerde üç bant verenler heterozigot ve 400 bç'de tek bant veren bireyler homozigot mutant olarak belirlendi. *RsaI* kesimine ait jel elektroforezi görüntülemesi Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.8** *CYP2E1* geni 5'sınır bölgesi PCR ürününün *RsaI* restriksiyon endonükleaz ile kesilmesinden sonra elde edilen jel görüntüsü. 7 numaralı hat 50-1000 bç'lik DNA m.a.m.'dir. 1-2-3-4 numaralı hatlardaki 350 bç'de kuvvetli bant veren numuneler homozigot yabancı tip bireyler, 400 ve 350 bç'lik bantların görüldüğü 5-6 numaralı hatlar heterozigot bireylerdir. Tüm hatlarda fotoğrafta net gözlenemeyen 50 bç'lik bant mevcuttur.

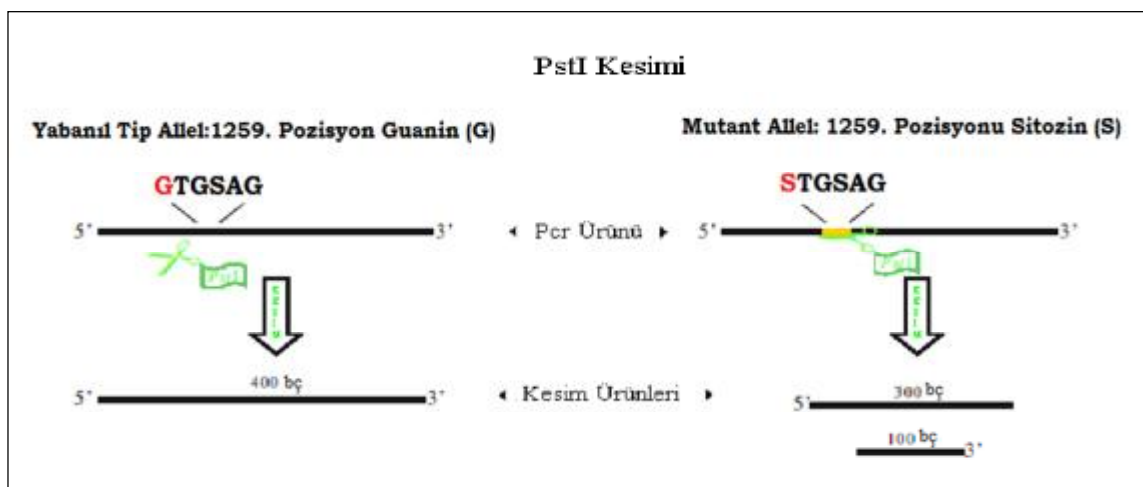
### 3.3.2. G-1259C Tek Nükleotid Polimorfizminde *PstI* Endonükleaz Kesimi

*CYP2E1* geninin 1259 numaralı pozisyonunda yabancı tip alellerde Guanin (G) nükleotidi bulunurken mutant alellerde aynı pozisyonda G yerine Sitozin (S) nükleotidi bulunur. *PstI* restriksiyon endonükleazın PCR ile çoğaltılmış 5' sınır bölgesindeki 1259. pozisyonda G bulunan yabancı tip alel üzerinde tanıma bölgesi bulunmaz (Şekil 3.5 ve Şekil 3.8). Bununla birlikte 1259. pozisyonda S taşıyan mutant alelde *PstI* için tanıma bölgesi (5'-STGSAG-3') mevcuttur. *RsaI* kesiminde enzim yabancı tip genotipleri kesip mutant olanları kesemez iken, *PstI* kesiminde enzim mutantları kestiği halde yabancı tip olanları kesemez. *PstI* kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

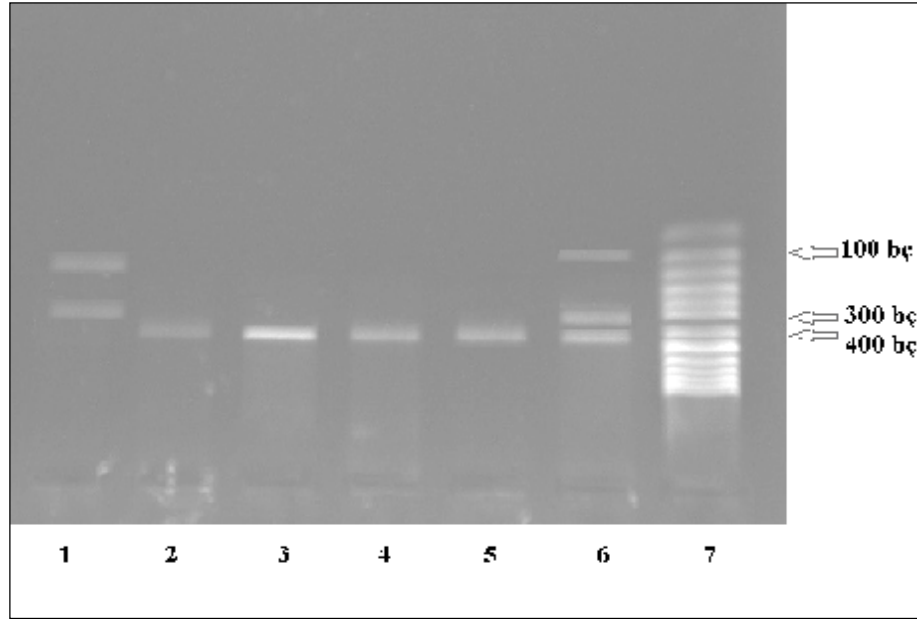
**Tablo 3.9** PstI kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşen	Stok konsantrasyon	Eklenecek hacim	Reaksiyon karışımındaki (30 µl) final konsantrasyon
PCR ürünü		10 µl	
<i>PstI</i> enzimi	10 Ü/µl	1 µl	10 Ü
Tampon çözeltisi	10x	3 µl	1x
Steril su		16 µl	

PstI kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizinde homozigot yabancı tipler, 400 bç'de tek bant verirken homozigot mutantlarda 300 ve 100 bç'de iki bant gözlenir. Heterozigotlarda ise 400, 300 ve 100 bç'lik üç adet bant gözlenir. PstI kesimine ait şematik kesim örneği Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

**Şekil 3.9** *CYP2E1* geni PstI kesimi bant kalıpları için şematik gösterim

Çalışmamızda 10 µl PCR ürünü, enzime özgü tampon çözelti içerisindeki 0,5 µl PstI enzimi ile kesim işlemine sokuldu. Kesim reaksiyonu, ortamda kesilmeden kalan ve genotipin yanlış değerlendirilmesine neden olabilecek hiçbir parça kalmaksızın ilgili tüm bölgelerin kesildiğinden emin olmak için 37 °C'de 24 saat süre ile devam ettirildi. Kesim ürünleri, %2'lik agaroz jele yüklenerek 90 voltta 30 dakika süre elektroforez yapıldı. Sonrasında yapılan görüntülemeye kesim ürününün verdiği bandın ya da bantların özelliğine göre bireyin genotipi tayin edildi. 400 bç'de tek bant verenler homozigot yabancı tip, 300 ve 100 bç'de iki bant verenler homozigot mutant ve 400, 300 ve 100 bç'de her üç bandı da verenler heterozigot genotipli olarak belirlendi. PstI kesimine ait jel elektroforezi görüntülemesi Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



**Şekil 3.10** PstI kesim ürünlerinin jel elektroforezinde görünümü. 20 µl kesim ürünü %2'lik jele yüklenerek 90 voltta 30 dakika yürütüldü. 7 numaralı hat 50-1000 bç DNA m.a.m.'dir. 1 numaralı hat fotoğrafta çok belirgin olmayan yalnızca 300 ve 100 bç'de bant veren homozigot mutant, 2-3-4-5 numaralı hatlar homozigot yabancı tip, 6 numaralı hat ise heterozigot bireye ait genotipi göstermektedir.

### 3.3.3. T7678A Tek Nükleotid Polimorfizminde DraI Endonükleaz Kesimi

*CYP2E1* geninin intron 6 bölgesinin PCR ile çoğaltılan 1000 bç'lik bölümü 7678 nükleotid pozisyonunda SNP gözlenir. Bu pozisyonda yabancı tipte Timin nükleotidi bulunurken mutant tipte Adenin nükleotidi bulunur. Çoğaltılmış bölgenin parsiyel nükleotid sekansını, primerlerin yerleşim bölgelerini, SNP ve DraI restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma bölgeleri Şekil 3.10'da şematik olarak gösterilmiştir. PCR ile çoğaltılan bölge şekilde belirtildiği gibi birisi SNP'yi kendi sekansında içeren iki tanıma bölgesi içerir. DraI kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları Tablo 3.11'de gösterilmiştir.

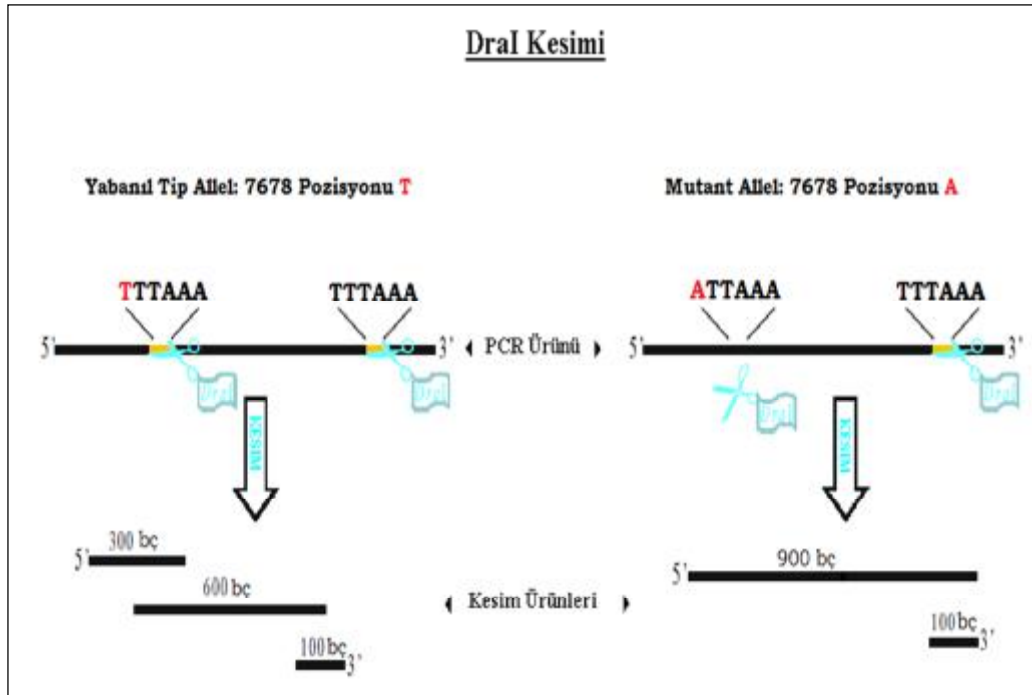
**Tablo 3.10** *DraI* kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşen	Stok konsantrasyon	Eklenen hacim	Reaksiyon karışımındaki (30 µl) final konsantrasyon
PCR ürünü		10 µl	
<i>DraI</i> enzimi	10 Ü/µl	0,5 µl	5 Ü
Tampon çözeltisi	10x	3 µl	1x
Steril su		16,5 µl	

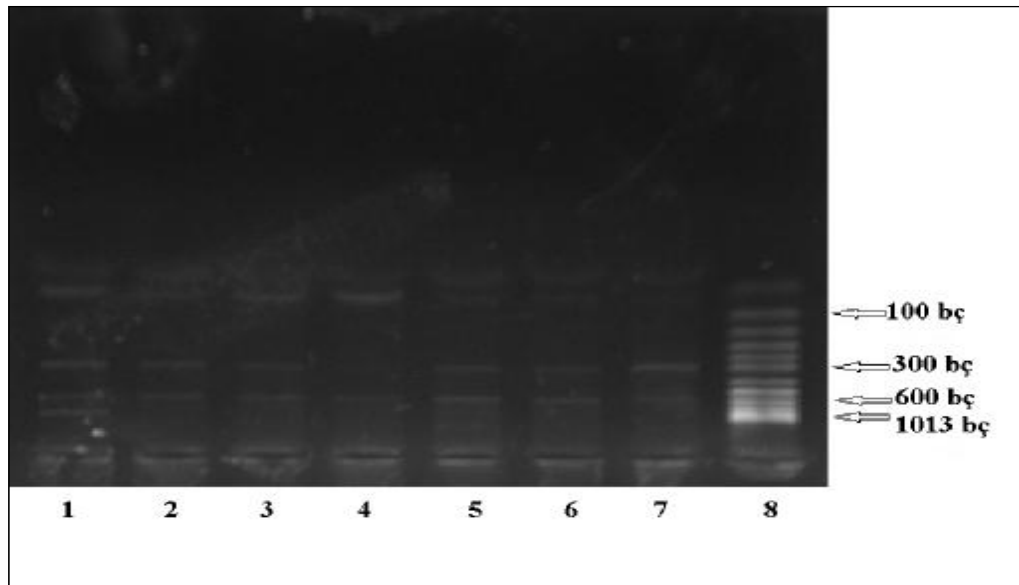
7363 GTGGTSTTAA GGS **TSGTSAG TTSSTGAAAG SAGG**TATTAT AGGSTSTGAA GTTATTTSSS  
7423 SSAAGAAAGT SGASATGTGA TGGAT **SSAG** GTSAGASSST GGGSTTTTST TGTTSTTTSS  
7483 TTSTTTTST TSTTTTTATT TATTTATTTT TTTTTTTGAG GGGASAGGGT STSAS.....  
7653 ASSASSASAS SSAGSTGATT AAAAA **TTAA** ..... AAAAAATTATT TTGGSTGGGS ASAGTGGSTG  
7713 ATASSTGTAA TSSTGGSAST TT.....  
8223 TAGGGGAASS ATGGAATSAA AAAATGT **TTT AAA**TTATTAT TTAGTAGGAG GTTSSAATAT  
8283 AGASAAAAGG AAAATAAATA TGATTGASAT GTATATATSG ATTGSSAAAT TGAASGTTTA  
8343 TTAASATTT **T GSGASTTTS SATSAGAGST S**TTAAAAAGA .....

**Şekil 3.11** *CYP2E1* T7678A polimorfizminde intron 6 bölgesi nükleotid sekansı. DraI restriksiyon endonükleaz enziminin çoğaltılan bölge üzerinde iki adet tanıma bölgesi vardır ve T7678A tek nükleotid polimorfizmi bunlardan birisinin üzerinde yer almaktadır. Sarı renkli sekanslar ön ve ters primerler, kırmızı ile boyanmış bölge tek nükleotid polimorfizmi, yeşil renk ile gösterilen yerler ise restriksiyon endonükleaz enzimi DraI için tanıma bölgeleridir. Noktalar şeklinde gösterilen yerler o bölgelerde pek çok nükleotid olduğunu belirtmek için kullanılmıştır. (Ulusoy 2004).

7678 numaralı pozisyonda Timin nükleotidi içeren yabancı tip alellerde DraI restriksiyon endonükleaz enzimi PCR ürününün her iki tanıma bölgesine de bağlanır ve bu pozisyondan keser. Kesim sonucu 1000 bç'lik gen sekansı 5' kısmından başlayarak 300 bç, 600 bç ve 100 bç'lik üç ayrı parçaya ayrılır. Yabancı tip alellerde jel elektroforezinde bu üç bant gözlenir. Mutant alelde ise aynı pozisyonda Adenin nükleotidi bulunduğundan kesim enzimi bu bölgeye (ATTAAA) bağlanamaz. İki tanıma bölgesinden yalnızca diğerine (TTTAAA bölgesine ) bağlanır. Bunun sonucu olarak ta 1000 bç'lik gen sekansı 5' kısmından başlayarak 900 bç ve 100 bç'lik iki ayrı parçaya ayrılır. DraI için mutant alel olan bireylerde jel elektroforezinde 900 ve 100 bç'lik iki bant gözlenir. Jel elektroforezinde heterozigot genotipe sahip olan bireylerde ise doğal olarak 900, 600, 300 ve 100 bç'lik dört adet bant gözlenir. DraI kesimine ait şematik çizim Şekil 3.11'de, jel elektroforezi görüntülemesi ise Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.12** *CYP2E1* geni DraI kesimi bant kalıpları için şematik gösterim



**Şekil 3.13** *CYP2E1* geni DraI kesim ürünlerinin jel elektroforezinde görünümü. 20 µl kesim ürünü %2'lik jele yüklenerek 90 voltta 30 dakika yürütüldü. 8 no'lu hat 50-1000 bç DNA m.a.m.'dir. 1 numaralı hat fotoğrafta çok belirgin olmayan dört bant veren heterozigot, 2-7 numaralı hatlar homozigot yabancı tip bireylere ait genotipi göstermektedir.



### 3.4. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmamızda, olgu ve kontrol gruplarından elde edilen genotip ve alel frekanslarının istatistiksel olarak karşılaştırılması ve değerlendirilmesinde Fisher Exact test ve ki-kare ( $\chi^2$ ) testi; olgu-kontrol grubu arasındaki alkol, sigara kullanımı gibi karakteristik özelliklerin değerlendirilmesinde ise student t test ve  $\chi^2$  testi kullanılmıştır.

## 4.BULGULAR

### 4.1. *CYP2E1* Geni C-1019T/G-1259C Polimorfizmlerinde Genotipleme

*CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi C-1019T polimorfizminde yabancı alelede 1019. pozisyonda bulunan sitozin (S) nükleotidi mutant alelede timin (T) nükleotidine dönüşmektedir. Aynı gen bölgesi üzerindeki G-1259C polimorfizminde ise yabancı alelede 1259. pozisyonda bulunan guanin (G) nükleotidi yerine mutant alelede sitozin (S) nükleotidi gelmektedir. Birbirlerine yakın pozisyonlarda olan bu polimorfizmlerin araştırıldığı çalışmalarda genotipleme için isimlendirmede genel olarak homozigot yabancı tip için c1/c1, homozigot mutant için c2/c2 ve heterozigot bireyler için c1/c2 şeklinde bir adlandırma yapılmıştır. Çalışmamızda da bu genel adlandırmaya uyulmuştur. Tablo 4.1'de *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi C-1019T ve G-1259C genotip olasılıkları gösterilmiştir.

**Tablo 4.1** *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi C-1019T ve G-1259C tek nükleotid polimorfizmlerine ait genotipler

5' sınır bölgesi genotipi	C-1019T (RsaI ) ve G-1259C (PstI) SNP
c1/c1	Homozigot yabancı tip
c1/c2	Heterozigot
c2/c2	Homozigot mutant

Çalışmamızda RsaI/PstI polimorfizmleri baş ve boyun tümörlü (BBT) olgu grubu (n=79) ve benzer epidemiyolojik özelliklerde sağlıklı kontrol grubu (SK) (n=98) üzerinde incelenmiş, olgu ve kontrol grubu arasında ilişki istatistiksel olarak araştırılmıştır.

#### 4.1.1. C-1019T (RsaI) polimorfizmi

C-1019T (RsaI, *CYP2E1*\*5B, rs2031920) polimorfizminde BBT grubunda 71 bireyin homozigot yabancı tip (c1/c1), 6 bireyin heterozigot (c1/c2) ve iki bireyin homozigot mutant (c2/c2) olduğu belirlendi. SK grubu genotiplerinde ise, 95 bireyin homozigot

yabanıl tip (c1/c1), 1 bireyin heterozigot (c1/c2) ve 2 bireyin homozigot mutant (c2/c2) olduğu tespit edildi. C-1019T (RsaI) polimorfizmi BBT grubuna ait genotip ve alel frekansları Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Sadece BBT grubunda heterozigot (c1/c2) birey sayısı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (p=0,04).

**Tablo 4.2** BBT grubu C-1019T (RsaI) polimorfizmi genotip ve alel frekansları

BBT grubu		
Genotip	Olgu sayısı (n)	Frekans (%)
c1/c1	71	89,9
c1/c2	6	7,6
c2/c2	2	2,5
<b>Toplam</b>	<b>79</b>	<b>%100</b>
Alel		Frekans (%)
c1		93,7
c2		6,3

C-1019T (RsaI) polimorfizmi SK grubuna ait genotip ve alel frekansları Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3** SK grubu C-1019T (RsaI) polimorfizmi genotip ve alel frekansları

SK grubu		
Genotip	Kontrol sayısı (n)	Frekans (%)
c1/c1	95	96,9
c1/c2	1	1,0
c2/c2	2	2,1
<b>Toplam</b>	<b>98</b>	<b>%100</b>
Alel		Frekans (%)
c1		97,5
c2		2,5

Çalışmanın sonuçlarına göre C-1019T (RsaI) polimorfizmi olgu ve sağlıklı kontrol gruplarına ait %95 güven aralığı (GA), olasılık oranı [Odds Ratio (OR)] ve p değerleri Tablo 4.4’de sunulmuştur.

**Tablo 4.4** C-1019T (RsaI) polimorfizminde olgu ve kontrol grupları arasında genotip-alel dağılımı ve karşılaştırmalı değerler

Genotipler	Olgu grubu (n=79)			Kontrol grubu (n=98)			OR	%95 GA	P değeri
	n	%	%95 GA	n	%	%95 GA			
c1/c1	71	89,9	85,2 -94,5	95	96,9	94,4- 99,3	0,28	0,05- 1,21	0,06
c1/c2	6	7,6	3,4- 11,7	1	1,0	0,0- 2,3	7,97	0,92- 179,64	0,04
c2/c2	2	2,5	0,0- 4,9	2	2,1	0,0- 4,1	1,24	0,12- 12,72	1,00
Aleller									
c1	148	93,7	91,0- 96,3	191	97,5	95,9- 99,0	0,38	0,11- 1,26	0,11
c2	10	6,3	3,6- 8,9	5	2,5	0,9- 4,0	2,58	0,79- 8,88	0,11

#### 4.1.2. G-1259C (PstI) Polimorfizmi

G-1259C (PstI, *CYP2E1*\*5B, rs3813867) polimorfizminde BBT grubunda 72 bireyin homozigot yabani tip (c1/c1), 6 bireyin heterozigot (c1/c2) ve 1 bireyin homozigot mutant (c2/c2) olduğu belirlendi. SK grubu genotiplerinde ise, 85 bireyin homozigot yabani tip (c1/c1), 10 bireyin heterozigot (c1/c2) ve 3 bireyin de homozigot mutant (c2/c2) olduğu tespit edildi. G-1259C (PstI) polimorfizmi BBT grubuna ait genotip ve alel frekansları Tablo 4.5'de gösterilmiştir. Gruplararası genotip ve alel frekansları bakımından istatistiksel fark bulunmadı.

**Tablo 4.5** *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi G-1259C (PstI) tek nükleotid polimorfizmi olgu grubu genotip ve alel frekansları

BBT grubu		
Genotip	Olgu sayısı (n)	Frekans (%)
c1/c1	72	91,1
c1/c2	6	7,6
c2/c2	1	1,3
<b>Toplam</b>	<b>79</b>	<b>%100</b>
Alel		Frekans (%)
c1		94,9
c2		5,1

G-1259C (PstI) polimorfizmi SK grubuna ait genotip ve alel frekansları Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.6** *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi G-1259C (PstI) tek nükleotid polimorfizmi sağlıklı kontrol grubu genotip ve alel frekansları

SK grubu		
Genotip	Kontrol sayısı (n)	Frekans (%)
c1/c1	85	86,7
c1/c2	10	10,2
c2/c2	3	3,1
<b>Toplam</b>	<b>98</b>	<b>%100</b>
Alel		Frekans (%)
c1		91,8
c2		8,2

Çalışmanın sonuçlarına göre G-1259C (PstI) Polimorfizmi olgu ve sağlıklı kontrol gruplarına ait %95 güven aralığı, olasılık oranı ve p değerleri Tablo 4.7'de sunulmuştur.

**Tablo 4.7** G-1259C (PstI) polimorfizminde olgu ve kontrol grupları arasında genotip-alel dağılımı ve karşılaştırmalı değerler

Genotipler	Olgu grubu (n=79)			Kontrol grubu (n=98)			OR	%95 GA	p değeri
	n	%	%95 GA	n	%	%95 GA			
<b>c1/c1</b>	72	91,1	86,6- 95,5	85	86,7	81,9- 91,4	1,57	0,54- 4,63	0,47
<b>c1/c2</b>	6	7,6	3,4- 11,7	10	10,2	5,9- 14,4	0,72	0,22- 2,13	0,60
<b>c2/c2</b>	1	1,3	0- 3,0	3	3,1	0,6- 5,5	0,37	0,01- 4,17	0,62
<b>Alleller</b>									
<b>c1</b>	150	94,9	92,4- 97,3	180	91,8	89,0- 94,5	1,66	0,65- 4,38	0,29
<b>c2</b>	8	5,1	2,6- 7,5	16	8,2	5,4- 10,9	0,60	0,22- 1,53	0,29

#### 4.2. CYP2E1 Geni T7678A Polimorfizminde Genotipleme

T7678A polimorfizmi (*CYP2E1*\*6, rs6413432), *CYP2E1* geninin intron 6 bölgesinde yer alır. Bu polimorfizmin RFLP analizi *DraI* restriksiyon enzimi ile yapılır. Bu polimorfizm için yapılan çalışmalarda genotip ve alel isimlendirmesinde genel olarak yabancı tip 'D' ile mutant alel ise 'C' ile gösterilir. Çalışmamızda da genotip ve aleller bu şekilde isimlendirildi. *DraI* polimorfizmine ait genotip olasılıkları Tablo 4.8'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.8** *CYP2E1* geni intron 6 bölgesi T7678A tek nükleotid polimorfizmine ait genotipler

5' sınır bölgesi genotipi	T7678A SNP
<b>DD</b>	Homozigot yabancı tip
<b>DC</b>	Heterozigot
<b>CC</b>	Homozigot mutant

BBT grubunda (n=79) 70 bireyin homozigot yabancı tip (DD), 8 bireyin heterozigot (DC) ve 1 bireyin homozigot mutant (CC) olduğu belirlenmiştir. SK grubu (n=98) genotipleri ise, 89 birey homozigot yabancı tip (DD) ve 9 birey heterozigot (DC) olarak belirlenmiş, hiç homozigot mutant bireye rastlanılmamıştır. Bulunan genotip ve alel dağılımları ve frekans yüzdeleri Tablo 4.9'da gösterilmiştir. Gruplararası genotip ve alel frekansları bakımından istatistiksel fark bulunmadı.

**Tablo 4.9** BBT grubu T7678A (DraI) polimorfizmi genotip ve alel frekansları

BBT grubu		
Genotip	Olgu sayısı (n)	Frekans (%)
DD	70	88,6
DC	8	10,1
CC	1	1,3
<b>Toplam</b>	<b>79</b>	<b>%100</b>
Alel		Frekans (%)
D		93,7
C		6,3

T7678A (DraI) polimorfizmi SK grubuna ait genotip ve alel frekansları Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

**Tablo 4.10** SK grubu T7678A (DraI) polimorfizmi genotip ve alel frekansları

SK grubu		
Genotip	Kontrol sayısı (n)	Frekans (%)
DD	89	90,8
DC	9	9,2
CC	-	-
<b>Toplam</b>	<b>98</b>	<b>%100</b>
Alel		Frekans (%)
D		95,4
C		4,6

Çalışmanın sonuçlarına göre T7678A (DraI) polimorfizmi olgu ve sağlıklı kontrol gruplarına ait %95 güven aralığı, olasılık oranı ve p değerleri Tablo 4.11'de sunulmuştur.

**Tablo 4.11** T7678A (DraI) polimorfizminde olgu ve kontrol grupları arasında genotip ve alellerin dağılımı ve karşılaştırmalı değerler

Genotipler	Olgu grubu (n=79)			Kontrol grubu (n=98)			OR	%95 GA	p değeri
	n	%	%95 GA	n	%	%95 GA			
DD	70	88,6	83,6 - 93,5	89	90,8	86,7- 94,8	0,78	0,26- 2,30	0,62
DC	8	10,1	5,4 - 14,7	9	9,2	5,1- 13,2	1,11	0,36- 3,35	1,00
CC	1	1,3	0 - 3,0	-	-	-	-	-	-
Aleller									
D	148	93,7	91,0 - 96,3	187	95,4	93,3- 97,4	0,71	0,25- 1,95	0,48
C	10	6,3	3,6- 8,9	9	4,6	2,5- 6,6	1,40	0,51- 3,87	0,48

### 4.3. ALDH2 Geni G1510A Polimorfizminde Genotipleme

*ALDH2\*1* aleli, tam enzim aktivitesine sahip olan yabanıl tip iken, *ALDH2\*2* mutant aleli inaktiftir. Çalışmamıza katılan 79 kişilik olgu grubu ve 98 kişilik kontrol grubuna ait bireylerin tümünün (%100) *ALDH2\*1/\*1* genotipine sahip olduğu saptandı. Heterozigot veya homozigot mutant genotiplere rastlanılmadı.

### 4.4. Gruplararası örneklem karakteristiklerinin karşılaştırılması

Olgu ve kontrol gruplarının karakteristik özelliklerine ait veriler Tablo 4.12'de verilmiştir.

**Tablo 4.12** Olgu ve kontrol gruplarının karakteristik özellikleri

Özellik	Olgu grubu (n:79)	Kontrol grubu (n:98)
Cinsiyet (kadın/erkek)	4/75	4/94
Yaş (yıl)	61,1 (10,1*)	58,40 (11,4*)
Sigara içme (paket/yıl)	40,17 (39,8*)	56,8 (31,4*)
Alkol tüketimi (drink**/hafta)	21,1 (19,2*)	15,0 (4,0*)
Diyet öyküsü	Özellik göstermiyor	Özellik göstermiyor

\*Standart sapma değerleridir. \*\*Klinikte; alınan alkollü içki miktarı 'drink' birimi ile ifade edilir. Bir 'drink' 13 gram (yaklaşık 16 ml) saf etanole eşdeğer alkollü içki miktarıdır.

Olgu ve kontrol grubunda yaş ve cinsiyet bakımından anlamlı bir farklılık yoktur. Çalışmamızda, diyet, alkol ve sigara kullanımı açısından olgu ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadığı görüldü ( $p>0,05$ ). Alkol kullanma geçmişi ve alkol kullanım oranı olgu ve kontrol grubu arasında anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Diğer taraftan alkol tüketim miktarlarının olgu grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü ( Olgularda 21,1 drink/hafta, kontrollerde 15,0 drink/hafta). Olgu grubu alkol tüketim miktarları açısından alt gruplara ayrıldığında gruplar arasında alel ve genotip frekansları açısından istatistiksel farklılık bulunmamıştır (İlgili veriler gösterilmemiştir.)

## 5.TARTIŞMA

Baş ve boyun kanserleri, ülkemizde tüm kanserler içerisinde görülme sıklığı açısından akciğer, meme, prostat, kolorektal ve mesane kanserlerinden sonra 6. sırada yer alır. Türkiye’de her yıl yaklaşık 4.500, dünyada ise 600.000 civarında yeni vaka gözlenir (WEB\_1 2014).

Yapılan bir çalışmada kanser vakalarının yaklaşık %80’inin nedeninin kimyasal maddeler olduğu bildirilmiştir (Matthias vd 1998). Baş ve boyun kanserlerinin oluşumunda sigara ve alkol alışkanlıkları, başlıca risk faktörleridir (Hiyama vd 2008, Olivieri vd 2009, Curado ve Hashibe 2009). CYP2E1 ve ALDH2, alkol metabolizmasına katkı sağlayan enzimler arasında bulunur. Bunun yanında CYP2E1 enzimi, sigara dumanında bulunan N-nitrozaminler, benzen ve halojenli hidrokarbonlar gibi karsinogenlerin metabolizasyonunda rol oynar. Bu yollardaki enzim genlerinde gözlenen polimorfizmler, kanser riski açısından önem taşır. Nitekim çalışmamızda da CYP2E1 genine ait RsaI; (CYP2E1\*5B, rs2031920), PstI; (CYP2E1\*5B, rs3813867), ve DraI; (CYP2E1\*6, rs6413432) polimorfizmleri ile ALDH2 (rs671) polimorfizmlerinin alel ve genotip dağılımları, toplumumuzdaki olgu ve kontrol gruplarında incelendi. Araştırmamız, bu polimorfizmlerin Türk popülasyonunda baş ve boyun kanseri riski için araştırıldığı ilk olgu-kontrol çalışmasıdır.

Çalışmamızda CYP2E1 RsaI polimorfizmi için heterozigot genotipli bireylerde hastalığa yatkınlıkta istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ) bir risk artışı olduğu tespit edildi. ALDH2 ve CYP2E1 genlerinde incelenen diğer tüm genotip ve alel frekansları için ise istatistiksel anlamlılık bulunmadığı belirlendi.

C-1019T (RsaI, CYP2E1\*5B, rs2031920) polimorfizminde olgu grubunda genotip frekansları, yabani tip (c1/c1) için 0,899, mutant (c2/c2) genotiplerde 0,025 olarak bulundu. Heterozigot (c1/c2) genotip frekansı 0,076 olarak hesaplandı. Kontrol gruplarının genotip frekansları da c1/c1 için 0,969, c2/c2 için 0,021, c1/c2 için ise 0,010



olarak bulundu. Alel frekanslarında ise olgu grubunda c1 için 0,937, c2 için 0,063; kontrol grubunda ise c1 aleli için 0,975, c2 aleli için 0,025 değerleri elde edildi. Olgu ve kontrol grubu değerleri karşılaştırıldığında RsaI polimorfizminde sadece heterozigot genotipli bireylerde istatistiksel olarak anlamlılık olduğu ( $p=0,04$ ) görüldü. Bu sonuç popülasyonumuzda RsaI polimorfizmi için heterozigot genotipli olan bireylerin baş ve boyun kanserine genetik yatkınlığı bulunduğu gösterir. Diğer farmakoepidemiolojik faktörlerin kontrol ve olgu gruplarında benzer olması nedeniyle bulunan yatkınlık ilişkisi doğrudan alkol metabolizmasında rol alan RsaI polimorfizmine atfedilebilir. Ayrıca heterozigot bireylerin hastalık riskini değerlendirmede ADH1C'ye ait genotiplerinin de değerlendirilmesinde yarar vardır.

*CYP2E1* geni RsaI polimorfizmi için Kafkas ırkı popülasyonlarda yapılan baş ve boyun kanseri olgu-kontrol çalışmalarının büyük bir kısmında (Lucas vd 1996, Matthias vd 1998, Neuhaus vd 2004, Gajecka vd 2005, Li vd 2005, Buch vd 2008, Boccia vd 2008, Brocic vd 2011) alel ve genotip frekanslarında baş ve boyun kanserine yatkınlık için istatistiksel anlamlılık bulunmazken; bir çalışmada (Bouchardy vd 2000) c2 mutant alel frekansında baş ve boyun kanseri için risk artışı bulunmuştur. Yapılan bir meta analizde Kafkas ırklarında risk bulunmadığı ancak Asya popülasyonlarında c2 homozigot bireylerde önemli ölçüde yüksek baş ve boyun kanseri riski bulunduğu belirtilmiştir (Tang vd 2010). Daha az yaygın olan c2 aleli dağılımı, çeşitli popülasyonlarda Asyalılar ve Kafkaslar arasında sırasıyla % ~25-50 ve %5-10 prevalansla değiştiğinden etnik farklılıkların bu değişik sonuçların oluşmasına katkı sunabileceği bildirilmiştir (Garte vd 2001). c2 varyant alel frekansı, olgu gruplarında Asyalılar arasında istatistiksel olarak anlamlı seviyelere ulaşırken Kafkas popülasyonlarında ilişki bulunmaması, CYP2E1 c2 alel prevalansınının daha az olması nedeniyle düşük istatistiksel güç ile açıklanabileceği belirtilmiştir (%5-10'e karşı, Asyalılarda % 25-50) (Tang vd 2010).

Türk popülasyonunda RsaI ve PstI polimorfizmleri için kontrol grupları üzerinde daha önce yapılmış iki ayrı çalışma mevcuttur (Ömer vd 2001, Ulusoy vd 2007). Kontrol gruplarında elde ettiğimiz sonuçlar, Kafkas ırklarında ve daha önce toplumumuzda yapılmış olan çalışmalarla genel olarak benzerlik göstermektedir. Araştırmamızdaki kontrol grubu RsaI genotip frekansları ile çeşitli kontrol

popülasyonlarında yapılan çalışmalardan elde edilen genotip frekansları Tablo 5.1'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

**Tablo 5.1** Çeşitli kontrol popülasyonlarında *CYP2E1* geni C-1019T (RsaI) polimorfizmi genotip frekansı dağılımları

Popülasyon (n)	C-1019T (RsaI) polimorfizmi genotipleri			Referans
	c1/c1	c1/c2	c2/c2	
Türk (çalışmamız) (98)	0,969	0,010	0,021	
Türk (116)	0,974	0,026	0,000	Ulusoy vd 2007
Türk (153)	0,961	0,039	0,000	Ömer vd 2001
Sırp (177)	0,904	0,09	<0,01	Brocic vd 2011
Alman (219)	0,942	0,057	0,000	Matthias vd 1998
Alman (299)	0,949	0,043	0,006	Neuhaus vd 2004
İtalyan (114)	0,910	0,090	0,000	Ingelman-Sundberg vd 1993
İtalyan (245)	0,934	0,061	0,004	Boccia vd 2008
İspanyol (200)	0,900	0,100	0,000	Gonzalez vd 1998
İsveçli (148 )	0,900	0,090	<0,01	Hayashi vd 1991
Fransız (460)	0,953	0,042	0,003	Lucas vd 1996
Fransız (172)	0,916	0,047	0,000	Bouchardy vd 2000
Alman (304)	0,951	0,049	0,000	Farker vd 1998
Alman (373)	0,943	0,057	0,000	Brockmöller ve Roots 1994
Hintli (227)	0,980	0,020	0,000	Sikdar vd 2003
Brezilyalı (191)	0,900	0,090	0,010	Nishimoto vd 2000
Amerikalı Kafkas (459)	0,922	0,078	0,000	London vd 1996
Afro-Amerikan (114)	0,868	0,123	0,090	Wu vd 1997
Afro-Amerikan (247) )	0,980	0,020	0,000	London vd 1996
Çinli (122)	0,516	0,435	0,049	Persson vd 1999
Çinli (150)	0,440	0,513	0,047	Tan vd 2000
Japon (196)	0,612	0,347	0,041	Ogawa vd 2003
Japon (200)	0,545	0,415	0,040	Murata vd 2001
Japon (612)	0,640	0,320	0,040	Oyama vd 1997
Tayvanlı (231)	0,580	0,351	0,069	Wang vd 1999
Tayvanlı (251)	0,574	0,386	0,040	Wu vd 2002
Tayvanlı-Çinli (297)	0,636	0,347	0,017	Kongruttanachok vd 2001
Mısırlı ( 235)	0,983	0,017	0,000	Hamdy vd 2002

G-1259C (PstI, *CYP2E1\*5B*, rs3813867) polimorfizminde olgu grubunda genotip frekansları yabancıl tip (c1/c1) için 0,911, mutant (c2/c2) genotiplerde 0,013 olarak bulundu. Heterozigot (c1/c2) genotip frekansı 0,076 olarak hesaplandı. Kontrol gruplarının genotip frekansları c1/c1 için 0,867, c2/c2 için 0,031, c1/c2 için ise 0,102 olarak bulundu. Alel frekanslarında ise olgu grubunda c1 için 0,949, c2 için 0,051; kontrol grubunda c1 aleli için 0,918, c2 aleli için 0,082 değerleri elde edildi. Bu sonuca göre yapılan istatistiksel değerlendirmede araştırma popülasyonumuzda PstI polimorfizmi ile baş ve boyun kanserine yatkınlık arasında anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı.

Çalışmamızla uyumlu olarak, *CYP2E1* geni PstI polimorfizmi için Kafkas ırkından populasyonlarda yapılan baş ve boyun kanseri olgu-kontrol çalışmalarında (Lucas vd 1996, Matthias vd 1998, Gonzales vd 1998, Li vd 2005) alel ve genotip frekanslarında baş ve boyun kanserine yatkınlık için istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadığı bildirilmiştir. Doğu Asya ırklarında sık karşılaşılan bu polimorfizm, Kafkas popülasyonlarında nadiren görülmektedir.

Araştırmamızdaki kontrol grubu PstI genotip frekansları ile çeşitli kontrol popülasyonlarına ait genotip frekansları Tablo 5.2'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Elde edilen veriler, Doğu Asya ırkları ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterirken ( $p<0,05$ ) Türk popülasyonu ve Kafkas ırkından diğer popülasyonlarla yapılan çalışmalarla genelde benzer sonuçlar elde edilmiştir.

CYP2E1'in bazı karsinojenleri metabolize ederek kansere yatkınlık kazandırması olasıdır. Ancak çok az çalışma, CYP2E1 genotipleri ile sigara içme alışkanlığı ve alkol tüketimi arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Bu durum, bireysel çalışmaların bu tür etkileşimleri ortaya çıkarmak için yeterli istatistiksel güce sahip olmamasından kaynaklanabilir. PstI ve RsaI genotipi ile sigara ve alkol tüketiminde baş ve boyun kanseri riski için tüm verilerin çok yönlü meta-analizinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmamaktadır. Sonuçlar, çevresel ve genetik risk faktörlerinin her ikisinin birden varlığında baş ve boyun kanseri üzerindeki kombine etkinin, ayrı durumdaki etkilerden daha kuvvetli olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte değerlendirmeye alınan çalışmalardaki c2 homozigotlar için düşük bir prevalans olduğu ancak bütün veriler toplandığında bile bir etkileşimin varlığını saptamak için istatistiksel gücün düşük olduğu belirtilmiştir (Tang vd 2010).

**Tablo 5.2** Çeşitli kontrol popülasyonlarında CYP2E1 geni G-1259C (PstI) polimorfizmi genotip frekansı dağılımları

Popülasyon (n)	G-1259C (PstI) polimorfizmi genotipleri			Ref
	c1/c1	c1/c2	c2/c2	
Türk (çalışmamız) (98)	0,911	0,076	0,013	
Türk (116)	0,974	0,026	0,000	Ulusoy vd 2007
Türk (153)	0,961	0,039	0,000	Ömer vd 2001
Alman (219)	0,942	0,057	0,000	Matthias vd 1998
Alman (299)	0,949	0,043	0,006	Neuhaus vd 2004
İtalyan (114)	0,910	0,090	0,000	Ingelman-Sundberg vd 1993
İtalyan (245)	0,934	0,061	0,004	Boccia vd 2008
İspanyol (200)	0,900	0,100	0,000	Gonzales vd 1998
İsveçli (148)	0,900	0,090	<0,01	Hayashi vd 1991
Fransız (460)	0,953	0,042	0,003	Lucas vd 1996
Alman (304)	0,951	0,049	0,000	Farker vd 1998
Alman (373)	0,943	0,057	0,000	Brockmöller ve Roots 1994
Hintli (227)	0,980	0,020	0,000	Sikdar vd 2003
Brezilyalı (191)	0,900	0,090	0,010	Nishimoto vd 2000
Mısırlı (235)	0,983	0,017	0,000	Hamdy vd 2002
Amerikalı Kafkas (1226)	0,927	0,070	0,002	Li vd 2005
Amerikalı Kafkas (459)	0,922	0,078	0,000	London vd 1996
Afro-Amerikan (114)	0,868	0,123	0,090	Wu vd 1997
Afro-Amerikan (247)	0,980	0,020	0,000	London vd 1996
Çinli (122)	0,516	0,435	0,049	Persson vd 1999
Çinli (150)	0,440	0,513	0,047	Tan vd 2000
Japon (196)	0,612	0,347	0,041	Ogawa vd 2003
Japon (200)	0,545	0,415	0,040	Murata vd 2001
Japon (612)	0,640	0,320	0,040	Oyama vd 1997
Tayvanlı (231)	0,580	0,351	0,069	Wang vd 1999
Tayvanlı (251)	0,574	0,386	0,040	Wu vd 2002
Tayvanlı-Çinli (297)	0,636	0,347	0,017	Kongruttanachok vd 2001

T7678A (DraI, CYP2E1\*6, rs6413432) polimorfizminde olgu grubunda genotip frekansları yabanıl tip (DD) için 0,886, heterozigot (DC) genotiplerde 0,101 olarak bulundu. Mutant (CC) genotip frekansı 0,013 olarak hesaplandı. Kontrol gruplarının genotip frekansları da DD için 0,908, DC için 0,092 olarak bulundu. Kontrol grubunda CC genotipli bireye rastlanmadı. Alel frekanslarında olgu grubunda D için 0,937, C için 0,063; kontrol grubunda ise D aleli için 0,954, C aleli için 0,046 değerleri elde edildi. Elde edilen bu sonuçlara göre araştırma popülasyonumuzda DraI polimorfizmi ile baş ve boyun kanserine yatkınlık arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı saptandı.

CYP2E1 geni DraI polimorfizmi için, Kafkas ırkılarında yapılan bazı olgu-kontrol çalışmalarında (Matthias vd 1998, Neuhaus vd 2004, Boccia vd 2008) alel ve genotipler için baş ve boyun kanserine yatkınlık için istatistiksel anlamlılık

bulunmazken, iki çalışmada (Lucas vd 1996, Bouchardy vd 2000) C mutant alel frekansında baş ve boyun kanseri için risk artışı olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir meta analiz çalışmasının sonuçlarına göre DraI polimorfizmi, Asyalı toplumlarda artmış kanser riski ile ilişkili iken, Kafkas ırklarında değildir (Tang vd 2010). Bu durum genetik ve çevresel faktörler açısından etnik farklılığı düşündürür (Hirschhorn vd 2002). Ancak özellikle Asya populasyonlarında DraI polimorfizmlerinin baş ve boyun kanseri riski üzerindeki etkisini doğrulamak için daha fazla çalışma gereklidir (Tang vd 2010).

Araştırmamızda elde edilen genotip ve alel frekansları, toplumumuzda daha önce kontrol grubunda yapılan diğer çalışmaların (Ömer vd 2001, Ulusoy vd 2007, Kayaaltı ve Söylemezoğlu 2010) sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Tablo 5.3’de DraI polimorfizmi için çeşitli populasyonların sağlıklı kontrol gruplarında yapılan araştırmalarla kendi çalışmamızdan elde edilen alel ve genotip dağılımları kıyaslamalı olarak sunulmuştur.

**Tablo 5.3** *CYP2E1* geni intron 6 bölgesi DraI polimorfizmi için çeşitli ırklara ait kontrol gruplarında genotip ve alel frekansı dağılımı

n= genotip ve alel sayısı		Genotipler						Aleller					
		DD		DC		CC		D			C		
Popülasyon	n	n	%	n	%	n	%	n	n	%	n	%	
<b>Türk (çalışmamız)</b>	98	89	90,8	9	9,2	0	0	196	187	95,4	9	4,6	
Türk (Kayaaltı ve Söylemezoğlu 2010)	163	139	85,3	23	14,1	1	0,61	326	301	92,3	25	7,7	
Türk (Ulusoy vd 2007)	206	173	83,9	32	15,5	1	0,49	412	378	91,7	34	8,3	
Türk (Ömer vd 2001)	153	129	84,3	23	15,0	1	0,66	306	281	91,8	25	8,2	
<b>Avrupalı</b>													
Kafkas (Garte vd 2001)	1360	1162	85,4	187	13,8	11	0,8	2720	2511	92,3	209	7,7	
İngiliz (Yang vd 2001)	155	129	83,2	25	16,1	1	0,7	310	283	91,3	27	8,7	
Fransız (Bouchardy vd 2000)	172	151	87,8	20	11,6	1	0,6	344	322	93,6	22	6,4	
Alman (Neuhaus vd 2004)	236	196	83,1	39	16,5	1	0,4	472	431	91,3	41	8,7	
<b>Asyalı</b>													
Kazak (Wang vd 2009)	107	77	72,0	29	27,1	1	0,9	214	183	85,5	31	14,5	
Uygur (Wang vd 2009)	149	99	66,4	44	29,6	6	4,0	298	242	81,2	56	18,8	
Kuzey Hindistanlı (Mittal vd 2005)	227	147	64,8	73	32,2	7	3,0	454	367	80,8	87	19,2	
Tamil (Soya vd 2005)	123	88	71,5	31	25,2	4	3,3	246	207	84,1	39	15,9	
Tayvanlı (Hildesheim vd 1997)	320	183	57,2	123	38,4	14	4,4	640	489	76,4	151	23,6	
Han Çinlileri (Wang vd 2009)	103	57	55,3	38	36,9	8	7,8	206	152	73,8	54	26,2	
<b>Amerikan</b>													
Meksikalı (Komishi vd 2003)	104	75	72,1	25	24	4	3,9	208	175	84,1	33	15,9	
Şilili (Quinones vd 2001)	129	82	63,6	40	31,0	7	5,4	258	204	79,1	54	20,9	
Brezilyalı (Rossini vd 2006)	251	218	86,9	32	12,7	1	0,4	502	468	93,2	34	6,8	

n= genotip ve alellerin sayısı

RsaI, PstI ve DraI polimorfizmlerinde nadir görülen mutant alellerin baş ve boyun kanseri riskini artırıcı mekanizması halen net değildir. *CYP2E1* geni 5' sınır bölgesi PstI ve RsaI polimorfizmlerinde c2 alelinin azalmış enzim aktivitesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Cadoni vd 2012, Hiyama vd 2008). *CYP2E1*, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin, N-nitrozaminler, benzen ve halojenli hidrokarbonlar gibi prokarsinojenlerin metabolik aktivasyonunda başlıca rol oynayan faz I enzimidir. Birçok ksenobiyotik *CYP2E1* enzimi tarafından deaktivasyona tabi tutularak doğrudan atılır ya da vücuttan atılımı kolaylaştırılmış ara bileşiklere çevrilir. Bazı ksenobiyotikler ise, *CYP2E1* tarafından biyotransformasyonla daha toksik aktif formlarına dönüştürülür (Bkz. Tablo 2.7). *CYP2E1* geni RsaI ve PstI polimorfizmlerinde nadir görülen c2 alelinin, *in vitro* çalışmalarda olasılıkla transkripsiyon ve enzim aktivitesini artırarak skuamoz hücreli baş ve boyun kanseri için daha yüksek risk oluşturduğuna dair elde edilen güçlü kanıtlar vardır (Hayashi vd 1991). Bu nedenle c2/c2 genotip taşıyan bireylerde, metabolik olarak aktif mutajenler ve karsinojenlerin daha çok oluşumu söz konusu olabilir. *CYP2E1* geni DraI polimorfizmlerinde nadir görülen mutant C aleli ise *in vitro* ekspresyon çalışmalarına göre artmış transkripsiyonel aktivite ile ilgilidir (Uematsu vd 1994). CC genotiplilerin, mutajenleri ve prokarsinojenleri daha çok metabolize etme yeteneği olabileceği bildirilmiştir (Tang vd 2010).

Çalışmamızda ALDH2 polimorfizmi açısından gerek olgu grubunda gerekse kontrol grubunda heterozigot veya mutant bireye rastlanmadı. Araştırma popülasyonumuzda baş ve boyun kanseri riski ile ALDH2 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı belirlendi. Çalışmamızın kontrol grubunda elde edilen sonuçlar Türk kontrol popülasyonunda daha önce yapılan iki ayrı çalışmanın (Goedde vd 1992, Kayaaltı ve Söylemezoğlu 2010) verileri ile benzerlik göstermektedir. *ALDH2*\*2/\*2 homozigot bireylerde serum asetaldehid düzeyleri, azalmış enzim aktivitesi nedeniyle *ALDH2*\*1/\*1 homozigot bireylere göre 13 kat, heterozigot bireylerde ise *ALDH2*\*1/\*1 homozigot bireylere göre 4 kat fazla olmaktadır (Hiyama vd 2008). Çin ve Japonya gibi uzakdoğu ırklarında sık görülen ve baş ve boyun kanserine yakınlıkla ilişkili bulunan *ALDH2*\*2 aleli, araştırma popülasyonumuzunda içinde bulunduğu Kafkas ırklarında son derece nadir görülmekte ve baş ve boyun kanseri ile ilişkili bulunmamaktadır (Goedde vd 1992, Hiyama vd 2008, Cichoz-Lach vd 2008, Ahn vd 2009). Çalışmamızda da bunu doğrulayan bir sonuç elde edilmiştir. Tablo 5.4'de çeşitli popülasyonların sağlıklı

kontrol gruplarında yapılan araştırmalarla kendi çalışmamızdan elde edilen alel ve genotip dağılımları kıyaslamalı olarak sunulmuştur.

**Tablo 5.4 ALDH2 (rs671) polimorfizmi için çeşitli ırklara ait kontrol gruplarında genotip ve alel frekansı dağılımı**

	Genotipler								Aleller			
	1/1		1/2		2/2		1		2			
Popülasyon	n	n	%	n	%	n	%	n	n	%	n	%
<b>Türk (alışmamız)</b>	98	98	100	0	0	0	0	196	196	100	0	0
Türk (Kayaaltı ve Söylemezoğlu 2010)	211	211	100	0	0	0	0	422	422	100	0	0
Türk (Goedde vd 1992)	57	57	100	0	0	0	0	108	108	100	0	0
<b>Avrupalı</b>												
Macar (Goedde vd 1992)	117	114	97,4	3	2,6	0	0	234	231	98,7	3	1,3
Fin (Goedde vd 1992)	85	85	100	0	0	0	0	170	170	100	0	0
Alman(Goedde vd 1992)	233	233	100	0	0	0	0	466	466	100	0	0
İsveçli (Goedde vd 1992)	90	90	100	0	0	0	0	180	180	100	0	0
Polonyalı Cichoş-Lach vd 2008)	54	54	100	0	0	0	0	108	108	100	0	0
Rus (Ahn vd 2009)	23	23	100	0	0	0	0	46	46	100	0	0
<b>Asyalı</b>												
Özbek (Ahn vd 2009)	161	156	96,9	5	3,1	0	0	322	317	98,4	5	1,6
Moğol (Shen vd 1997)	35	29	83	6	17	0	0	70	64	91,4	6	8,6
Çinli (Guo vd 2008)	480	252	52,5	195	40,6	33	6,9	960	699	72,8	261	27,2
Japon (Matsuo vd 2006)	768	383	49,9	314	40,9	71	9,2	1536	1080	70,3	456	29,7
Hintli (Goedde vd 1992)	167	167	100	0	0	0	0	334	334	100	0	0
<b>Amerikan</b>												
Meksikalı (Konishi vd 2003)	104	104	100	0	0	0	0	208	208	100	0	0
Meksikalı-Huikol (Gordillo-Bastidas vd 2010)	100	99	99	1	1	0	0	200	199	99,5	1	0,5
Meksikalı –Mestizo (Gordillo-Bastidas vd 2010)	227	227	100	0	0	0	0	454	454	100	0	0
<b>Afrikalı</b>												
Afrikalılar (Goedde vd 1992)	49	49	100	0	0	0	0	98	98	100	0	0
<b>Diğer</b>												
Amerikan Yahudileri (Fischer vd 2007)	129	129	84,4	19	14,7	1	0,8	258	237	91,9	21	8,1

**n= genotip ve alellerin sayısı**

## 6.SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamız, CYP2E1 RsaI polimorfizminde heterozigot genotipli olmanın baş boyun kanserlerine yatkınlıkta rol oynayabileceğini göstermektedir. Fakat yatkınlığın (eğer gerçekten varsa) daha kesin olarak ortaya konması için daha geniş bir olgu grubuna gereksinim vardır. CYP2E1'e ait PstI ve DraI polimorfizmlerinde ise baş boyun kanserlerine yatkınlıkla ilişkisi saptanmamıştır. Benzer şekilde araştırma popülasyonumuzda baş ve boyun kanseri riski ile ALDH2 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Diğer taraftan CYP2E1'e ait her 3 polimorfizminde Denizli ve yöresi dışındaki yurdumuzun farklı bölgelerinde de araştırılmasında yarar vardır.



## 7. KAYNAKLAR

- Abraham, J., Allegra, J.C., Gulley, J. (2009) Klinik Onkoloji El Kitabı, Mayadağlı, A., Parlak, C., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 667s
- Ahmad Kiadaliri, A., Jarl, J., Gavriilidis, G., Gerdtham, U.G. (2013) Alcohol drinking cessation and the risk of laryngeal and pharyngeal cancers: a systematic review and meta-analysis. PLoS One., doi: 10.1371/journal.pone.0058158.
- Ahn, K. S., Abdiev, S., Rahimov, B., Malikov, Y., Bahramov, S., Okada, R., Naito, M., Hamajima, N. (2009) Asian Alcohol dehydrogenase 1B and Aldehyde dehydrogenase 2 polymorphisms in Uzbekistan. Pac. J. Cancer Prev., 10(1):17-20.
- Akar N. (1999) Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş. 2. Baskı, Antıp A.Ş. Tıp Kitapları ve Bilimsel Yayınları, Ankara, s167-230.
- Akhtar, S. (2012) Areca nut chewing and esophageal squamous-cell carcinoma risk in Asians: a meta-analysis of case-control studies. Cancer Causes Control., doi: 10.1007/s10552-012-0113-9.
- Altun, M., Yazıcı, H., Hafız, G., Dalay, N. (1998) Nazofarinks kanserlerinde c-ERB B2 gen amplifikasyonunun ve onkoprotein düzeyinin araştırılması. Türk Otolaringoloji Arşivi, 36(3-4); 85-90.
- Başaran N. (2003) Tıbbi Genetik, 8. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri., İstanbul, s300.
- Baykal Y., Özet A., Güran Ş., Özet G. (1996) P53 ve onkogenezdaki rolü. Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi., 6(2):111-115.
- Bilgel, N. (2003) Baş-boyun kanserlerinin epidemiyolojisi, Baş-Boyun Kanserleri, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, s34-35.
- Boccia, S., Cadoni, G., Sayed-Tabatabaei, F.A., Volante, M., Arzani, D., De Lauretis, A., Cattel, C., Almadori, G., van Duijn, C.M., Paludetti, G., Ricciardi, G. (2008) CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 134:93-100.

- Bouchardy, C., Hirvonen, A., Coutelle, C., Ward, P.J., Dayer, P., Benhamou, S. (2000) Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int. J. Cancer.*, 87(5):734-740.
- Brocic, M., Supic, G., Zeljic, K., Jovic, N., Kozomara, R., Zagorac, S., Zlatkovic, M., Magic Z. (2011). Genetic polymorphisms of ADH1C and CYP2E1 and risk of oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, doi:10.1177/0194599811408778.
- Brockmöller, J., Roots, I. (1994) Assessment of liver metabolic function. Clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.*, 27(3):216-248.
- Buch, S. C., Nazar-Stewart, V., Weissfeld, J.L., Romkes, M. (2008) Case-control study of oral and oropharyngeal cancer in whites and genetic variation in eight metabolic enzymes. *Head Neck.*, doi: 10.1002/hed.20867.
- Cadoni, G., Boccia, S., Petrelli, L., Di Giannantonio, P., Arzani, D., Giorgio, A., De Feo, E., Pandolfini, M., Galli, P., Paludetti, G., Ricciardi, G. (2012) A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 32(1):1-11.
- Cichoz-Lach, H., Celinski, K., Slomka, M. (2008) Alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms and alcohol chronic pancreatitis among Polish individuals. *HPB (Oxford)*, doi: 10.1080/13651820801938909.
- Crabb, D.W., Edenberg, H.J., Bosron, W.F., Li, T.K. (1989) Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant. *J. Clin. Invest.*, 83:314-316.
- Curado, M.P., Hashibe, M. (2009) Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.* doi: 10.1097/CCO.0b013e32832a68ca.
- Cury, N. M., Russo, A., Galbiatti, A.L., Ruiz, M.T., Raposo, L.S., Maniglia, J.V., Pavarino, E.C., Goloni-Bertollo, E.M., (2012). Polymorphisms of the CYP1A1 and CYP2E1 genes in head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol. Biop. Rep.*, doi:10.1007/s11033-011-0831-1
- Demiral, A. (2003) Nazofarenks Kanserleri, Baş-Boyun Kanserleri,(Altun,M.) Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, s145-183.
- Demokan S, Suoglu Y, Gözeler M, Demir D, Dalay N. (2010) N-acetyltransferase 1 and 2 gene sequence variants and risk of head and neck cancer. *Mol. Biol. Rep.*, doi: 10.1007/s11033-009-9905-8.
- Engin, K., Özkan, L. (2003) Baş-Boyun Kanserlerinde Etiyoloji,Risk Faktörleri, Korunma, Baş-Boyun Kanserleri, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa,s39-43.

- Fairbrother, K. S., Grove, J., De Waziers, I., Steimel, D.T., Day, C.P., Crespi, C.L., Daly, A.K. (1998) Detection and characterization of novel polymorphisms in the CYP2E1 gene. *Pharmacogenetics.*, 8(6):543-552.
- Farker, K., Lehmann, M. H., Kastner, R., Hoffmann, A., Janitzky, V., Schubert, J., Matz, U., Hofmann, W. (1998) CYP2E1 genotyping in renal cell/urothelial cancer patients in comparison with control populations. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 36(9):463-468.
- Fischer, M., Wetherill, L. F., Carr, L.G., You, M., Crabb, D.W. (2007) Association of the aldehyde dehydrogenase 2 promoter polymorphism with alcohol consumption and reactions in an American Jewish population. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 31(10):1654-1659.
- Gajecka, M., Rydzanicz, M., Jaskula-Sztul, R., Kujawski, 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 Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.*, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.027.
- Garte, S., Gaspari, L, Alexandrie, A. K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J. L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Boffetta, P., Bouchardy, C., Breskvar, K., Brockmoller, J., Cascorbi, I., Clapper, M. L., Coutelle, C., Daly, A., Dell'Omo, M., Dolzan, V., Dresler, C.M., Fryer, A., Haugen, A., Hein, D. W., Hildesheim, A., Hirvonen, A., Hsieh, L. L., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, I., Kang, D., Kihara, M., Kiyohara, C., Kremers, P., Lazarus, P., Le Marchand, L., Lechner, M. C., van Lieshout, E. M., London, S., Manni, J. J., Maugard, C. M., Morita, S., Nazar-Stewart, V., Noda, K., Oda, Y., Parl, F. F., Pastorelli, R., Persson, I., Peters, W. H., Rannug, A., Rebbeck, T., Risch, A., Roelandt, L., Romkes, M., Ryberg, D., Salagovic, J., Schoket, B., Seidegard, J., Shields, P.G., Sim, E., Sinnett, D., Strange, R. C., Stücker, I., Sugimura, H., To-Figueras, J., Vineis, P., Yu, M. C., Taioli, E. (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, (12):1239-1248.
- Goedde, H. W., Agarwal, D. P., Fritze, G., Meier-Tackmann, D., Singh, S., Beckmann, G., Bhatia, K., Chen, L. Z., Fang, B., Lisker, R., et al. (1992) Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum. Genet.*, 88(3):344-346
- Gonzalez, M. V., Alvarez, V., Pello, M. F., Menendez, M. J., Suarez C, Coto, E. (1998) Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase- M1, and cytochromes P450IIE1 and P450IID6 in the susceptibility to head and neck cancer. *Journal of Clinical Pathology.*, 51(4):294-298.

- Gordillo-Bastidas, E., Panduro, A., Gordillo-Bastidas, D., Zepeda-Carrillo, E. A., Garcia-Banuelos, J. J., Munoz-Valle, J. F., Bastidas-Ramirez, B. E. (2010) Polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes in indigenous Mexican population: unusual high frequency of *CYP2E1*\*c2 allele. *Alcohol Clin Exp Res.*, doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.01075.x.
- Guo, Y. M., Wang, Q., Liu, Y. Z., Chen, H. M., Qi, Z., Guo, Q. H. (2008) Genetic polymorphisms in cytochrome P450E1, alcohol and aldehyde dehydrogenases and the risk of esophageal squamous cell carcinoma in Gansu Chinese males. *World J. Gastroenterol.* , 14(9):1444-1449.
- Gustavsson, P., Jakobsson, R., Johansson, H., Lewin, F., Norell, S., Rutkvist, L. E. (1998) Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. *Occup. Environ. Med.* 55:393-400.
- Hamdy, S. I., Hiratsuka, M., Narahara, K., El-Enany, M., Moursi, N., Ahmed, M. S., Mizugaki, M. (2002) Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2E1*) and dihydropyrimidine dehydrogenase (*DPYD*) in the Egyptian population. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 53(6):596-603.
- Hanna, L., Crosby, T., Macbeth, F. (2012) *Pratik Klinik Onkoloji*, Özdemir, F., İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, 401s
- Hashibe, M., Brennan, P., Strange, R.C., Bhisey, R., Cascorbi, I., Lazarus, P., Oude Ophuis, M. B., Benhamou, S., Foulkes, W. D., Katoh, T., Coutelle, C., Romkes, M., Gaspari, L., Taioli, E., Boffetta, P. (2003) Meta- and pooled analyses of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *CYP1A1* genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 12(12):1509-1517.
- Hastürk, S., Yüksel, M. (2000) *Akciğer Kanseri*, Bil Medya Group, İstanbul, 325s
- Hayashi, S., Watanabe, J., Kawajiri, K. (1991) Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J. Biochem.*, 110:559-565.
- Hecht, S. S. (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco induced cancer. *Nature*, 3;733-744.
- Hildesheim, A., Anderson, L. M., Chen, C. J., Cheng, Y. J., Brinton, L. A., Daly, A. K. (1997) *CYP2E1* genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89:1207–1212.
- Hirschhorn, J. N., Lohmueller, K., Byrne, E., Hirschhorn, K. (2002) A comprehensive review of genetic association studies. *Genet.*, 4:45-61.
- Hiyama, T., Yoshihara, M., Tamaka, S., Chayama, K. (2008) Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk: *Int. J. Oncol.*, 32: 945–973.

- Hu, Y., Hakkola, J., Oscarson, M., Ingelman-Sundberg, M. (1999) Structural and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes: identification of a polymorphic repeat in the human gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263(2):286-293.
- Indulski, J. A., Lutz, W. (2000) Metabolic genotypes in relation to individual susceptibility to environmental carcinogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 73;71-85.
- Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Yin, H., Terelius, Y., Eliasson, E., Clot, P., Albano, E. (1993) Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease. *Alcohol.*, 10(6):447-452.
- Karcı, B. (2003) Nazal Kavite ve Paranazal Sinüs Kanserleri, Baş-Boyun Kanserleri, Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, s187-211.
- Kayaaltı, Z., Söylemezoğlu, T. (2010) Distribution of ADH1B, ALDH2, *CYP2E1*\*6, and *CYP2E1*\*7B genotypes in Turkish population. *Alcohol.*, doi: 10.1016/j.alcohol.2010.06.002.
- Khelifi, R., Chakroun, A., Hamza-Chaffai, A., Rebai, A. (2014) Association of CYP1A1 and CYP2D6 gene polymorphisms with head and neck cancer in Tunisian patients. *Mol. Biol. Rep.*, doi: 10.1007/s11033-014-3117-6.
- Kızılkaya, O. (2003) Orofarinks Kanserleri, Baş-Boyun Kanserleri, (Özkan, L.) Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, s273-302.
- Kongruttanachok, N., Sukdikul, S., Setavarin, S., Kerekhjanarong, V., Supiyaphun, P., Voravud, N., Poovorawan, Y., Mutirangura, A. (2001) Cytochrome P450 2E1 polymorphism and nasopharyngeal carcinoma development in Thailand: a correlative study. *BMC Cancer.*, 1: 4-8.
- Konishi, T., Smith, J. L., Lin, K. M., Wan, Y. J. (2003) Influence of genetic admixture on polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes: analyses of mutations on the CYP2E1, ADH2, ADH3 and ALDH2 genes in a Mexican-American population living in the Los Angeles area. *Alcohol Alcohol.*, 38(1):93-94.
- Kortunay, S., Koseler, A., Kara, O. C., Topuz, B., Atalay, O. E. (2010) Frequencies of ADH1C alleles and genotypes in a Turkish head and neck cancer population. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, doi: 10.1358/mf.2010.32.3.1440739.
- Li, G., Liu, Z., Sturgis, E.M., Chamberlain, R.M., Spitz, M.R., Wei, Q. (2005) CYP2E1 G1532C, NQO1 Pro187Ser, and CYP1B1 Val432Leu polymorphisms are not associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14(4):1034-1036.

- Liu, L., Wu, G., Xue, F., Li, Y., Shi, J., Han, J., Zhang, X., Na, Y., Zhang, H., Tang, X., Pu, H., Yuan, Q., Zhang, L., Yang, M. (2013) Functional CYP1A1 genetic variants, alone and in combination with smoking, contribute to development of head and neck cancers. *Eur. J. Cancer.*, doi: 10.1016/j.ejca.2013.01.028.
- London, S. J., Daly, A. K., Cooper, J., Carpenter, C. L., Navidi, W. C., Ding, L., Idle, J. R. (1996) Lung cancer risk in relation to the CYP2E1 Rsa I genetic polymorphism among African-Americans and Caucasians in Los Angeles country. *Pharmacogenetics.*, 6(2):151-158.
- Lu, D., Yu, X., Du, Y. (2010) Meta-analyses of the effect of cytochrome P450 2E1 gene polymorphism on the risk of head and neck cancer. *Mol Biol Rep.* doi: 10.1007/s11033-010-0375-9.
- Lucas, D., Menez, C., Floch, F., Gourlaouen, Y., Sparfel, O., Joannet, I. (1996) Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic Caucasians. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 20:1033-1037.
- Maier, M., Kraft, K., Steinestel, K., Schramm, A., Lorenz, K. J., Tisch, M., Schwerer, M., Maier, H. (2013) Human papilloma virus in squamous cell cancer of the head and neck. A study at the Ulm Military Hospital, Germany., *HNO.*, doi: 10.1007/s00106-013-2676-5.
- Mao, L., Hong, W. K., Papadimitra, V. A. (2004) Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell*,5;311-316.
- Matsuo, K., Rossi, M., Negri, E., Oze, I., Hosono, S., Ito, H., Watanabe, M., Yatabe, Y., Hasegawa, Y., Tanaka, H., Tajima, K., La Vecchia, C. (2012) Folate, alcohol, and aldehyde dehydrogenase 2 polymorphism and the risk of oral and pharyngeal cancer in Japanese. *Eur. J. Cancer Prev.*, doi: 10.1097/CEJ.0b013e32834c9be5.
- Matsuo, K., Wakai, K., Hirose, K., Ito, H., Saito, T., Suzuki, T., Kato, T., Hirai, T., Kanemitsu, Y., Hamajima, H., Tajima, K. (2006) A gene-gene interaction between ALDH2 Glu487Lys and ADH2 His47Arg polymorphisms regarding the risk of colorectal cancer in Japan. *Carcinogenesis.*, 27(5):1018-1023.
- Matthias, C., Bockmühl, U., Jahnke, V., Jones, P. W., Hayes, J. D., Alldersea, J., Gilford, J., Bailey, L., Bath, J., Worrall, S.F., Hand, P., Fryer, A.A., Strange, R. C. (1998): Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics*, 8(2):91-100.
- McBride, O. W., Umeno, M., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J. (1987) A TaqI polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E1). *Nucleic Acids Res.*, 15(23):10071.

- Miller, M. C., Mohrenweiser, H. W., Bell, D. A. (2001) Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters*, 120;269-280.
- Mittal, R. D., Srivastava, D. S., A, M., B, M. (2005) Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes (CYP2E1, GSTP1) and susceptibility to bladder cancer in North India. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 6(1):6-9.
- Murata, M., Watanabe, M., Yamanaka, M., Kubota, Y., Ito, H., Nagao, M., Katoh, T., Kamataki, T., Kawamura, J., Yatani, R., Shiraishi, T. (2001) Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. *Cancer Lett.*, 165(2):171-177.
- Neafsey, P., Ginsberg, G., Hattis, D., Johns, D. O., Guyton, K. Z., Sonawane, B. (2009) Genetic polymorphism in CYP2E1: Population distribution of CYP2E1 activity. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.*, doi: 10.1080/10937400903158359.
- Neuhaus, T., Ko, Y. D., Lorenzen, K., Fronhoffs, S., Harth, V., Bröde, P., Vetter, H., Bolt, H. M., Pesch, B., Brüning, T. (2004) Association of cytochrome P450 2E1 polymorphisms and head and neck squamous cell cancer. *Toxicol Lett.*, 151(1):273-282.
- Nishimoto, I. N., Hanaoka, T., Sugimura, H., Nagura, K., Ihara, M., Li, X. J., Arai, T., Hamada, G. S., Kowalski, L. P., Tsugane, S. (2000) Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 9(7):675-680.
- Niu, Y., Hu, Y., Wu, M., Jiang, F., Shen, M., Tang, C., Chen, N. (2012) CYP2E1 RsaI/PstI polymorphism contributes to oral cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.*, doi: 10.1007/s11033-011-0777-3. *Nucleic Acids Res.*, 18(23):7194.
- Nussbaum, R., McInnes, R. R., Willard H. F., (2005). İnsanlarda Genetik Varyasyon: Mutasyon ve Polimorfizm, (Emre, S.) Thompson&Thompson Tıbbi Genetik, Güneş Kitabevi, İstanbul, s79–93.
- Ogawa, K., Suno, M., Shimizu, K., Yoshida, M., Awaya, T., Matsubara, K., Shiono, H. (2003). Genotyping of cytochrome P450 isoform genes is useful for forensic identification of cadaver. *Legal Medicine.*, 5(3), 132-138.
- Olivieri, E. H. R., Da Silva, S. D., Mendonca, F. F., Urata, Y. N., Vidal, D. O., Faria, M. A. (2009) *CYP1A2\*1C*, *CYP2E1\*5B* and *GSTM1* polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral. Oncol.* 45(9):73–79.
- Oyama, T., Kawamoto, T., Mizoue, T., Sugio, K., Kodama, Y., Mitsudomi, T., Yasumoto, K. (1997) Cytochrome P4502E1 polymorphism as a risk factor for lung cancer: In relation to p53 gene mutation. *Anticancer Res.*, 17, 583-588.

- Ömer, B., Ozbek, U., Akköse, A., Kiliç, G. (2001) Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 in the Turkish population. *Cell Biochem. Funct.*,19(4):273-275.
- Özerol, E., (1996) Sitokrom P450 monooksijenaz enzim sistemleri., *Journal of Turgut Özal Medical Center* 3(3):257-275
- Persson I, Johansson I, Lou Y.C., Yue Q. Y., Duan L.S., Bertilsson, L., Ingelman-Sundberg, M. (1999) Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int. J. Cancer.*, 81(3):325-329.
- Persson, I., Johansson, I., Bergling, H., Dahl, M. L., Seidegard, J., Rylander, R., Rannug, A., Högberg, J., Sundberg, M. I. (1993) Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.*, 319(3):207-211.
- Purdue, M. P., Jarvholm, B., Bergdahl, I. A., Hayes, R. B., Baris, D. (2006) Occupational exposures and head and neck cancers among Swedish construction workers. *Scand. J. Work. Environ. Health.*, 32:270-275.
- Quinones, L., Lucas, D., Godoy, J., Caceres, D., Berthou, F., Varela, N., Lee, K., Acevedo, C., Martinez, L., Aguilera, A. M., Gil, L. (2001) *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Letters.*, 174:35-44.
- Quintero, K., Giraldo, G. A., Uribe, M. L., Baena, A., Lopez, C., Alvarez, E., Sanchez, G. I. (2013) Human papilloma virus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz. J. Otorhinolaryngol.*, doi: 10.5935/1808-8694.20130065.
- Ragin, C. C., Modugno, F., Gollin, S. M. (2007) The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papilloma virus. *J. Dent. Res.* 86(2):104-114.
- Rossini, A., Lima, S. S., Rapozo, D. C., Faria, M., Albano, R. M., Pinto, L. F. (2006) CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res.*, 39(2):195-201.
- Ruwali, M., Pant, M. C., Shah, P. P., Mishra, B. N., Parmar, D. (2009) Polymorphism in cytochrome P450 2A6 and glutathione S-transferase P1 modifies head and neck cancer risk and treatment outcome. *Mutat. Res.*, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.04.007.
- Salway, J. G. (1994) *Metabolism at a glance*. Nussbaum R. L., Blackwell scientific publications, Londra, s86–87.



- Sasco, A. J., Secretan, M. B., Straif, K. (2004) Tobacco smoking and cancer: a brief of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 45;53-59.
- Schütze, M., Boeing, H., Pischon, T., Rehm, J. (2011) Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. doi: 10.1136/bmj.d1584.
- Seitz, H. K., Stickel, F. (2007) Molecular mechanisms of alcohol mediated carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.*, 7:599–612.
- Shen, Y. C., Fan, J. H., Edenberg, H. J., Li, T. K., Cui, Y. H., Wang, Y. F., Tian, C. H., Zhou, C. F., Zhou, R. L., Wang, J., Zhao, Z. L., Xia, G. Y. (1997) Polymorphism of ADH and ALDH genes among four ethnic groups in China and effects upon the risk for alcoholism. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21(7):1272-1277.
- Sikdar, N., Mahmud, S. A., Paul, R. R., Roy, B. (2003) Polymorphism in CYP1A1 and CYP2E1 genes and susceptibility to leukoplakia in Indian tobacco users. *Cancer Lett.* 30;195(1):33-42.
- Solak M., Bağcı H., Şengil A. Z., Öztaş S. (2000) Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi., Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları., Afyon, 345s
- Soya, S. S., Padmaja, N., Adithan, C. (2005) Genetic polymorphisms of CYP2E1 and GSTP1 in a South Indian population-comparison with North Indians, Caucasians and Chinese. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 6(3):315-319
- Sultatos, L. G., Pastino, G. M., Rosenfeld, C. A., Flynn, E. J. (2004). Incorporation of the genetic control of alcohol dehydrogenase into a physiologically based pharmacokinetic model for ethanol in humans. *Toxicol Sci.*, doi:10.1093/toxsci/kfh057.
- Szyfter, K., Szymeja, Z., Szyfter W., Hemminki, K., Banaszewski, J., Sztul-Jaskula, R., Louhelainen, J. (1999) Molecular and cellular alterations in tobacco smoke associated larynx cancer. *Mutation Research*, 445;259-274.
- Tamakoshi, A., Hamajima, N., Kawase, H., Wakai, K., Katsuda, N., Saito, T., Ito, H., Hirose, K., Takezaki, T., Tajima K. (2003) Duplex polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for genotyping alcohol dehydrogenase beta subunit (ADH2) and aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2). *Alcohol Alcoholism.* 38(5):407-410.
- Tan, W., Song, N., Wang, G. Q., Liu, Q., Tang, H. J., Kadlubar, F. F., Lin, D. X. (2000) Impact of genetic polymorphisms in cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferases M1, T1, and P1 on susceptibility to esophageal cancer among high-risk individuals in China. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 9(6):551-556.

- Tang, K., Li, Y., Zhang, Z., Gu, Y., Xiong, Y., Feng, G., He, L., Qin, S. (2010) The PstI/RsaI and DraI polymorphisms of CYP2E1 and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 21 case-control studies. *BMC Cancer*, doi: 10.1186/1471-2407-10-575.
- Temizkan G., Arda N. (2007) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.*, Nobel Tıp Kitabevleri., İstanbul, 345s.
- Tezel, İ. (2003) Kulak ve Temporal Kemik Kanserleri, Baş-Boyun Kanserleri, (Basut, O.) Nobel Tıp Kitabevleri, Bursa, s215-233.
- Tuma D. J., Casey C. A. (2003) Dangerous byproducts of alcohol breakdown-focus on adducts. *Alcohol Res. Health.* ;27(4):285-90.
- Uematsu, F., Ikawa, S., Kikuchi, S., Sagami, I., Kanamaru, R., Abe, T., Satoh, K., Motomiya, M., Watanabe, M. (1994) Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: Possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics*, 4:58-63
- Ulusoy, G. (2004) Genetic polymorphisms of alcohol inducible *CYP2E1* in Turkish population., Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 123s
- Ulusoy, G., Arınç, E., Adalı, O. (2007) Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. *Arch. Toxicol.*, 81(10):711-718.
- Umeno, M., McBride, O. W., Yang, C. S., Gelboin, H. V., Gonzalez, F. J. (1988) Human ethanol-inducible P4502E1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry*, 27(25):9006-9013.
- Wang S. L., Lee, H., Chen, K.W., Tsai, K.J., Chen, C.Y., Lin, P. (1999) Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer.*,26(1):27-34.
- Wang, S. M., Zhu, A. P., Li, D., Wang, Z., Zhang, P., Zhang G. L. (2009) Frequencies of genotypes and alleles of the functional SNPs in CYP2C19 and CYP2E1 in mainland Chinese Kazakh, Uygur and Han populations. *J. Hum. Genet.*, doi: 10.1038/jhg.2009.41.
- Watanabe, J., Hayashi, S., Nakachi, K., Imai, K., Suda, Y., Sekine, T., Kawajiri, K. (1990) PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene.
- WEB\_1. (2014). Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı web sitesi. <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx> (27.10.2014)

- WEB\_2. (2014). Wikipedia web sitesi. <https://en.wikipedia.org/wiki/CYP2E1> (26.10.2014)
- WEB\_3 (2014). Wikipedia web sitesi. [http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase\\_chain\\_reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction) (20.10.2014)
- WEB\_4 (2012). TÜİK web sitesi. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1042](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1042) (13.10.2013)
- Wittekindt, C., Wagner, S., Mayer, C.S., Klussmann, J.P., (2012) Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS Curr. Top. Otorhinolaryngol. Head Neck Surg.* doi: 10.3205/cto000091.
- Wu, R. M., Cheng, C. W., Chen, K. H., Shan, D. E., Kuo, J. W., Ho, Y. F., Chern, H. D. (2002). Genetic polymorphism of the CYP2E1 gene and susceptibility to Parkinson's disease in Taiwanese. *I. Neural Transm.*,109 (11):1403-1414.
- Wu, X., Shi, H., Jiang, H., Kemp, B., Hong, W. K., Delclos, G. L., Spitz, M. R. (1997) Associations between cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis.*, 18(5):967-973.
- Yang, B., O'Reilly, D. A., Demaine, A. G., Kingsnorth, A. N. (2001) Study of polymorphisms in the CYP2E1 gene in patients with alcoholic pancreatitis. *Alcohol.*, 23(2):91-97.
- Zain, R. B. (2007) Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer - a brief overview. *Oral Oncol.*, 37:205–210.
- Zavras, A. I., Pitiphat, W., Wu, T., Cartos, V., Larn, A., Douglas, C. W., Diehl, S. R. (2003) Insulin like growth factor II receptor gene-167 genotype increases the risk of oral squamous cell carcinoma in humans. *Cancer Research*, 63:296-297

## 8. ÖZGEÇMİŞ

13.09.1980 tarihinde K.Maraş'ın Elbistan ilçesinde doğdum. İlk ve ortaokulu Elbistan'da tamamladım. 1997 yılında Ankara'da Çankaya lisesinden, 2003 yılında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden mezun oldum. 2004 yılında Kıbrıs Türk Barış Kuvvetleri Komutanlığında yedek subay olarak askerlik hizmetimi tamamladım. 2005-2007 yılları arasında Ankara'da serbest eczane işlettim. 2007 yılında Denizli Devlet Hastanesinde çalışmaya başladım. Halen aynı hastanede kemoterapi ve TPN ünitelerinin sorumluluğunu yürütmekteyim. 2012 yılından bu yana Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji bölümünde yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.