



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**SİGARA İÇEN, LARENKS KANSERİ OLAN VE OLMAYAN KİŞİLERDE GLUT1,  
HIF1 $\alpha$  VE TBX21 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Cihan USLU**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Mustafa TÜZ**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
tarafından 4726-TU1-16 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA - 2017**

## ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince birlikte çalışma onuruna eriştiğim, eğitimime büyük katkıları bulunan çok değerli hocalarım; öncelikle tez danışmanı hocam Prof. Dr. Mustafa TÜZ'e, Prof. Dr. Hasan YASAN'a, Prof. Dr. Erdoğan OKUR'a,

Birlikte gece gündüz demeden kliniğin yükünü sırtladığımız sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. İsmail ÇEVİK, Dr. Deniz DİLEK'e, bende emeği bulunan kıdemli asistanlarım Op. Dr. Abdurrahman YETİŞ, Op. Dr. İsmail ÇOBAN, Op. Dr. Mehmet Emre SİVRİCE, Op. Dr. Bilal SARATAŞ'a, tüm KBB hemşirelerimiz ve personelimize, odyologlarımıza, poliklinik hemşire ve sekreterlerimize,

Tez çalışmamda öncelikle tez konumun belirlenmesinde, daha sonra genetik veri ve analizlerin yapılmasında katkıda bulunan Tıbbî Biyoloji ve Genetik AD öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Serkan KURTGÖZ'e, çalışmamı destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Canımdan çok kıymet verdiğim, daimî destekçilerim anneme, babama ve biricik kardeşime, can yoldaşım, sevgili nişanlım Nazife ÇEKEÇEK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. Cihan USLU**  
**ISPARTA-2017**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
RESİMLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Larenks Embriyoloji ve Histolojisi.....	3
2.2. Larenks Klinik Anatomisi.....	4
2.2.1. Larenks Boşluğu (Endolarenks).....	4
2.2.2. Supraglottik Bölge.....	4
2.2.3. Glottis.....	5
2.2.4. Subglottik Bölge.....	5
2.3. Larenks Kanserinde Etiyopatogenez.....	5
2.4. Larenks Kanserinde Fizyopatoloji.....	6
2.5. Larenks Kanser Gelişiminde Etkili Olduğu Düşünülen Proteinler.....	7
2.5.1. GLUT1 (Glucose Transporter Isoform 1).....	7
2.5.2. HIF1 $\alpha$ (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha).....	9
2.5.3. TBX21 (T-box Transcription Factor Protein 21).....	10
2.6. SNP (Single Nucleotide Polymorphism).....	10
<b>3. MATERYAL ve METOD.....</b>	<b>14</b>
3.1. Çalışmaya Dâhil Edilme Kriterleri.....	14
3.2. Polimorfizm Tespit Yöntemi.....	14
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	14

3.2.2. Real Time PCR Aşaması.....	16
3.2.3. Analiz.....	20
3.3. İstatistiksel Değerlendirme.....	20
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>20</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>23</b>
<b>6. SONUÇ.....</b>	<b>32</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>33</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>36</b>

## SİMGELELER ve KISALTMALAR

- SNP** : Single Nucleotide Polymorphism
- rs** : Reference Single Nucleotide Polymorphism
- GLUT1** : Glucose Transporter Isoform 1
- HIF1 $\alpha$**  : Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha
- TBX21** : T-box Transcription Factor Protein 21
- DNA** : Deoxyribonucleic Acid
- RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism
- g:** : Gravity
- MSI** : Microsatellite Instability
- Tm** : Melting Temperature
- MnSOD**: Manganese-Dependent Superoxide Dismutase
- GPx1** : Glutathione Peroxidase 1
- CAT262**: Catalase C-262T Polymorphism
- HCC** : Hepatocellular Carcinoma
- HBV** : Hepatitis B Virus
- RCC** : Renal Cell Carcinoma
- VHL** : Von Hippel–Lindau
- AAA** : Abdominal Aort Anevrizması
- PAH** : Periferik Arter Hastalığı
- MI** : Miyokard İnfarktüsü

**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim 1.</b> GLUT1 <i>rs710218</i> PCR aşaması.....	17
<b>Resim 2.</b> HIF1 $\alpha$ <i>rs11549465</i> PCR aşaması.....	18
<b>Resim 3.</b> TBX21 <i>rs17250932</i> PCR aşaması.....	19



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b>Şekil 1.</b> <i>rs710218</i> hasta genotip dağılımı.....	21
<b>Şekil 2.</b> <i>rs710218</i> kontrol genotip dağılımı.....	21
<b>Şekil 3.</b> <i>rs11549465</i> hasta genotip dağılımı.....	21
<b>Şekil 4.</b> <i>rs11549465</i> kontrol genotip dağılımı.....	21
<b>Şekil 5.</b> <i>rs17250932</i> hasta genotip dağılımı.....	22
<b>Şekil 6.</b> <i>rs17250932</i> kontrol genotip dağılımı.....	22

## 1. GİRİŞ ve AMAC

Larenks kanserleri, tüm baş ve boyun kanserlerinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Bu bölge kanserleri ülkemizde en sık görülen kanserler sıralamasında %9,7 ile 6. sırada gelmektedir. Bu oran A.B.D.'de ise yaklaşık %1 olarak bildirilmektedir. Aradaki belirgin farkın, ülkemizde kullanımı halen oldukça yaygın olan tütün ürünlerine bağlı olması olasıdır. Kadın/erkek oranı hemen eşit olarak bildirilmektedir. Görülme sıklığı 5. dekattan sonra yükselişe geçmekte ve 7.-8. dekatlar civarında tepe noktasına ulaşmaktadır. Larenks kanserlerinin %90'dan fazlası yassı hücreli kanserlerdir. Bununla birlikte bu organı oluşturan tüm doku gruplarından kaynaklanan; kondrom, adenokanserler, nöroendokrin tümörler, minör tükrük bezleri tümörleri, indiferansiye karsinom gibi benign ya da malign neoplazilere rastlamak mümkündür.

Larenks kanseri etyolojisinde çevresel ve genetik faktörler rol alır. Çevresel faktörlerden özellikle sigara kullanımı ve alkol kullanımı en önemli risk faktörü olmakla birlikte HPV enfeksiyonu, sebze ve meyvelerden fakir diyet, kömür tozuna maruziyet, salamura et ve balık ürünlerinin yoğun tüketimi de sorumlu tutulmaktadır. Genetik faktörlerden de bazı enzimler, proteinler, mutasyon ve polimorfizmler ön plandadır.

Hiç sigara içmeyenlerle oranlandığında sigara tiryakilerinde belirgin olarak baş-boyun bölgesindeki organlarda kanser görülme sıklığı yüksektir. İçilen sigara miktarı, kullanılan tütün türü, pasif sigara içimi ve sigara içme süresi bağımsız risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Sigara içmeyen ancak sigara içilen ortamlarda dumana maruz kalan bireyler diğer kanser ve kanser dışı rahatsızlıklarla beraber larenks kanser gelişimi açısından da artmış risk grubunda kabul edilmektedir. Genel olarak kabul gören, sigara dumanına maruz kalma açısından bir emniyet sınırı olmadığıdır. Sigara dumanı, içinde en az 69 çeşidi kanserojen olduğu bilinen 7000 kimyasal içermektedir.



Larenks kanserlerinde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörler de suçlanmaktadır. Bazı proteinlerin/enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin varlığı ve polimorfizm sorumlu tutulmaktadır. Yapılan çalışmalarda tümör baskılayıcı gen mutasyonları ve düşük gen ifadesinin, birçok kanserde olduğu gibi larenks kanseri gelişimi, invazyonu, lenf nodu ve uzak metastaz gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir.

Biz bu çalışmada larenks kanseri tanılı hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda, daha önce bir takım hastalıklarla ve malignitelerle ilişkisi gösterilmiş olan, glukoz metabolizması ve hücre içi transportundan sorumlu GLUT1 (*rs710218*), dokunun hipoksiye adaptasyonunu regüle eden HIF1 $\alpha$  (*rs11549465*) ve immün yanıt regülasyonunda rol alan TBX21 (*rs17250932*) gen polimorfizmlerinin sıklığı ile larenks kanseri gelişimi ve tümör büyüklüğü, histolojik grade, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ilişkisini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Larenks Embriyoloji ve Histolojisi

Larenks, boyunda önde ve orta hatta kıkırdak ve iskeletten oluşan, çevresine ligamentler ve membranlar ile asılı, mobil, internal kaslarının çalışması ile öncelikli olarak alt solunum yollarının korunması, solunum ve fonasyon görevlerini üstlenen bir organdır. Yeni doğanlarda 1-4. servikal vertebralar arasında yer alan larenks, puberteye kadar yavaşça aşağıya iner. Puberte sonrası erkeklerde daha belirgin olacak şekilde büyüyerek 3-6. servikal vertebralar arasında normal konumunu alır.

Larenksin taslağı intrauterin yaşamın 33. gününde oluşur; 7. ve 8. haftalarda şekillenme belirginleşir (1). Brankiyal arklardan larenks ve komşu yapıların gelişmesi şöyledir:

- 2. brankiyal ark olan hiyoid brankiyal arkının (Reichert kıkırdağı) ön kısmından hiyoid kemiğin üst kısmı ve küçük boynuzu; arka kısımdan stapes, stilohiyoid proçes ve stilohiyoid ligament,
- 3. brankiyal arktan hiyoid kemiğin alt kısmı ve büyük boynuzu,
- 4. brankiyal arktan tiroid kıkırdak,
- 5. ve 6. brankiyal arklardan krikoid kıkırdak ve aritenoid kıkırdaklar (2).

Memelilere özgü olan epiglotun kıkırdak yapısı ise farklı olarak brankiyal ark yapısından kaynaklanmaz (2).

Tirohiyoid membran ve ekstrinsik kaslarının tutunmasıyla fonksiyonel olarak larenksin bir parçası olarak çalışan hiyoid kemik bir korpus, birer çift büyük ve küçük boynuzlardan oluşur. Küçük boynuz ikinci brankial arktan, büyük boynuz ve korpus ise üçüncü brankial arktan gelişir. Korpusa suprahiyoid ve infrahiyoid kaslar yapışır.

Sekizinci haftada oluşan vokal kordlar, vokal ligamentlerin mukozal tabakasını oluşturur. Vokal kordların kraniyalinde oluşan ikinci plika çiftine ventriküler band denir. Larenks kasları 3. ve 4. postoral arkların mezenkiminden köken alır ve bu arkları innerve eden vagal sinirin superior farengeal dalı ve rekürrent larengeal dalı yoluyla innerve olur (2).

Supraglottik bölge bukkofarengeal tomurcuktan, (3. ve 4. brankiyal arklardan)

glottis ve subglottis de trakeobronşiyal tomurcuktan (5. ve 6. brankiyal arklardan) gelişir.

Farklı embriyolojik kaynaktan gelen supraglottik ve glottik bölgelerin vasküler, lenfatik ve sinirsel yapıların anatomik kaynakları da farklıdır ve bu da supraglottik kanserlerin glottise yayılmasındaki azlığı açıklar (3).

Embriyonik yaşamın ortalarında, krikoid kıkırdağın alt ucu 4. servikal vertebranın üst hizasına gelecek şekilde yerleşir. Böylece larenks, nazal havayoluna paralel durumundan, dik açı yapar duruma geçer (3).

Endolarenks mukozası silyalı çok katlı kolumnar epitel ve çok katlı yassı epitelden oluşur. Çoğunluğu respiratuvar epitle döşeli olmakla birlikte epiglotun suprahiyoid kısmı ariepiglottik kıvrımların üst kısımları ve vokal kordların serbest kenarları çok katlı yassı epitle kaplıdır.

## **2.2. Larenks Klinik Anatomisi**

### **2.2.1. Larenks Boşluğu (Endolarenks)**

Larenks kavitesi, farenkse ilişkili larengeal girişten, krikoid kıkırdağın alt kenarına kadar devam eder. Vokal kordlar larenksi üç bölgeye ayırır:

### **2.2.2. Supraglottik Bölge**

Vestibulum larenks: larengeal kavitenin farenkse açıldığı bir boşluktur. Ventriküler bantlarla larenksin girişi arasındaki yer olup, yukarıda geniş, aşağıda dardır. Önde epiglotun serbest kenarlarıyla, yanlarda ariepiglottik plikanın serbest kenarlarıyla, arkada aritenoid kıkırdağlar ve bunların arasında seyreden aritenoid kaslar ve üzerini örten larengeal mukozayla sınırlıdır.

Ventriküler bantlar: önde petiolun hemen altına, yanlarda tiroid kıkırdağa ve arkada aritenoid kıkırdağın anterolateral yüzüne yapışır. Ventriküler bant mukozası çok sayıda seröz ve müköz glandlar içerir.

Ventrikül: Yukarıda ventrikül bant ile aşağıda vokal kordlar arasındaki girintidir. Ön kısmında, tiroid kartilaj medial yüzeyi ile ventrikül bant arasından yukarı doğru uzanan ve sakkül (ventriküler apendiks) adı verilen küçük bir poş vardır.

### 2.2.3. Glottis

Vokal kordlar, ön komissürde fikse, aritenoidlerin vokal proçesine yapıştığı arka komissürde ise hareketlidirler. Vokal kordu örten çok katlı yassı epitel altındaki vokal ligamente sıkıca bağlıdır. Rima glottis, önde vokal kordlar, arkada da aritenoid kıkırdakların vokal çıkıntıları ve tabanları arasındaki açıklıktır. Önde vokal kordlar arasındaki intermembranöz bölüm rima glottisin 3/5 ini oluşturur. Arkada aritenoidler arası alan ise interkartilajinöz bölge olarak adlandırılır. Yetişkinlerde üst solunum yolunun en dar kısmıdır (4).

### 2.2.4. Subglottik Bölge

Trakeaya kadar olan bu bölüm, vokal kordların alt iç yüzeyinden, krikoidin alt seviyesine kadardır. Yanlarda konus elastikus yer alır. Üst bölümü eliptiktir, aşağıya doğru genişleyip sirküler bir yapı kazanarak trakeayla devam eder (4).

### 2.3. Larenks Kanserinde Etiyopatogenez

Larenks kanseri dünyada yıllık tanı alan tüm malignitelerin yaklaşık % 2-5'ini oluşturmaktadır (5). Baş-boyun kanserlerinin deriden sonra en sık rastlanan yerleşimidir. Sigara ve alkol maruziyetinin erkek ve kadınlarda eşit olmasından dolayı erkek/kadın için 6/1 oranı eşit seviyelere yaklaşmıştır.

Larenks kanserinin büyük bölümü glottik kanserlerdir (% 55-75). Supragottik kanserler % 24-42'sinden sorumludur. En nadir larenks kanseri ise subglottik kanserlerdir (% 1-6).

Larengeal kanserler en sık 5-7. dekatlar arasında görülür.

Larenks kanserinde en büyük etken tütün kullanımıdır (6). Sigara içmeyenlerde larenks kanserinin görülmesi son derece nadirdir. Günlük içilen sigara sayısı ile yaşa göre ölüm oranı arasında neredeyse lineer bir korrelasyon mevcuttur. Önemli bir husus da, tütündeki kanserojen maddenin nikotin olmadığı, polisiklik aromatik hidrokarbonları içeren rezidü katranın karsinojenik olduğudur. İçilen sigara miktarı ile kanser riski doğru orantılıdır. Sigara kullanımının bırakılmasından 5-6 yıl sonra kanser riski düşmeye başlar ve yaklaşık 15 yıl sonra hiç sigara içmeyenler ile aynı risk sınırına iner.

Alkolün etkisi sigara için ko-karsinojendir. Daha çok supraglottik tümörlerde kanserojen etkinlik sergiler.

Larengeal kanser için herediter predispozisyon bu hastalarda saptanan yüksek doz arilhidrokarbon hidroksilaz düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur. Primer larenks kanser dokularında saptanan bir hyaluronidaz tipi olan PH-20 metastatik lezyonlarda daha da yüksek bulunur ve böylece tümör belirteci olarak kullanılır ve böylelikle prognostik değere sahiptir (7). Herpes simpleks enfeksiyonundaki artmış larenks kanseri insidansı ise bu hastalarda gözlenen immünosüpresyona bağlanmıştır. Retinoblastom protein varlığının saptanamaması yüksek oranda lenf nodu metastazı varlığını gösterir ve bu olgularda 5 yıllık survey istatistiksel olarak düşüktür (8). Laringoseller ve p53 (tümör supressör proteini) suçlanan diğer etmenlerdir (9,10). p53 genindeki mutasyonların da larenks kanserli hastaların tedavilerinin sonucuyla ilişki olduğu bulunmuştur. p53 gen mutasyonlarının bu öngörü özelliği günümüzde üst düzeyde araştırmaların ilgi alanıdır (11).

#### **2.4. Larenks Kanserinde Fizyopatoloji**

Larenks kanserinin yayılım şekli ve davranışı lezyonun yerine bağlıdır. Tümör yayılımını engelleyen doğal bariyerlere invazyon olursa prognoz oldukça kötüleşir. Kıkırdak invazyon en sık ligamanların bağlanma noktalarında ve ossifiye kıkırdak noktalarında görülür. Perinöral yayılım nadirdir.

Supraglottik tümörler epiglot yoluyla preepiglottik boşluğa ve vallekülaya yayılabilirler veya kuadrangüler boşluk içinde yukarı uzanarak piriform sinüse invazyon yaparlar. Bu tümörlerin boyunda bilateral level II ve III lenf nodlarına drene olan zengin lenfatik ağı, tüm T evrelerinde %25-75 sıklıkta görülen unilateral ve bilateral servikal metastazların sebebidir (12,13).

Suprahiyoid epiglot kanserleri çoğunlukla ekzofitiktir ve kıkırdak harabiyeti ve derin invazyon potansiyeli kısıtlıdır.

İnfrahioid epiglot kanserlerinin ise epiglottik kıkırdak üzerindeki fenestralardan geçerek, tiroepiglottik ligaman aracılığıyla, preepiglottik boşluğa, daha sonra da valleküla ve dil köküne yayılım özellikleri bulunur.

Ventriküler band tümörleri genellikle ülserasyon ve derin infiltrasyon gösterir. Tiroid kıkırdak tutulumu geç görülür.

Ariepiglottik plikalar ve aritenoid kıkırdakların kanserlerinin biyolojik davranışları daha çok piriform sinüs kanserlerine benzediğinden, supraglottik lezyonlar olarak değil de marjinal tümörler olarak sınıflandırılırlar ve yüksek oranda submukozal yayılım, erken servikal ve uzak metastaz yaparlar (14).

Glottik lezyonlar genellikle vokal kordların ön yarısından veya serbest kenarının süperior yüzeyinden kaynaklanırlar. Derinde vokal kası tutabilirler. Paraglottik boşluk tutulduğunda, yayılımı sınırlayacak hiç bir bariyer noktası kalmaz. Krikotiroid membran hizasında ekstralarineal yayılım sıktır. Tiroaritenoid kas invazyonu vokal kord fiksasyonunun en sık nedenidir.

Subglottik lezyonlarda, bu bölgede mukoza ve altındaki kıkırdak arasında bariyer oluşturacak herhangi bir kas bulunmadığından krikoid kıkırdak ve krikotiroid membran invazyonu sık gözlenir. Erken dönemde kord fiksasyonu yapabilir. Delphian nodunun klinik önemi rekürren lenf zincirine (Guaggenheim) ve mediasten lenf zincirine yayılmasına aracı olmasıdır (3,15).

Çok nadir görülen posterior komissür lezyonları genellikle erken evrede bilateral vokal kord fiksasyonuna, dolayısıyla erken trakeotomi ihtiyacına yol açarlar.

## **2.5. Larenks Kanser Gelişiminde Etkili Olduğu Düşünülen Proteinler**

### **2.5.1. GLUT1 (Glucose Transporter Isoform 1):**

GLUT1 ya da SGLT1, insanın bütün dokularında bulunur ancak özellikle alyuvarlarda bulunur. Aynı zamanda beynin kan damarlarındaki düz hücrelerin koruyucu kılıfına tutunmuşlardır (16). Beyine glukoz taşınması kan-beyin engelinden sodyumdan bağımsız olan yüksek molekül ağırlıklı glukoz taşıyıcı protein GLUT1 aracılığı ile gerçekleşir. Diğer taşıyıcı proteinler beyinde farklı hücre tiplerinin membranlarında mevcuttur. Astrositler düşük molekül ağırlıklı glukozillenmiş GLUT1'ce zengindir (17). GLUT1'in glukozu güçlü bir afinitesi vardır ve alyuvarların ve beynin doğru fonksiyon gösterebilmesi için uygun olan glukoz seviyelerini almasını sağlar (16).

SLC2A1 geninin kodladığı GLUT1 12 alfa-helikol transmembran yapı içerir ve hücrelerin bazolateral yüzeylerinde yerleşim gösterir. Glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak, GLUT1 hücrenin dış yüzeyinden iç yüzeyine doğru tek yönlü glukoz transportuna aracılık eder (18). Glukoz transporter süper ailesi, insan genomunda tanımlanmış 14 izoformdan oluşmaktadır (16). Bunlardan ilk tanımlanmış olan GLUT1, ilk olarak eritrositlerden elde edilmiş ve aynı zamanda üzerinde en fazla çalışma yapılmış olanıdır.

GLUT1 seviyesi glukoz metabolizmasına bağlı olarak bütün hücre tiplerinde farklı olarak görülür. GLUT1 en çok kardiyovasküler sistemde, beyinde (astrozitlerde), alyuvarlarda, daha az olarak da karaciğerde, kaslarda, böbrekte (tübüler ve glomerüler alanlarda) ve adipöz dokuda bulunur (18). Kanseri hücrelerinde glukoz taşınım ve metabolizmasında anahtar hız kısıtlayıcı faktördür. GLUT1 ekspresyonu normal epitelyal hücrelerde ve benign epitelyal tümörlerde büyük ölçüde saptanamaz. Bununla birlikte, GLUT1 insan karsinom tiplerinin çoğunda aşırı eksprese olmaktadır. Glukoz transporter'ın belli bir tipinin belirgin şekilde up regülasyonu tümör biyolojisinde önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Bu yüzden insan karsinomlarındaki artmış GLUT1 ekspresyonu aynı zamanda artmış bir metabolik durumu, artmış enerji kullanımını, ve bunlara ilişkin agresif ve metastatik davranıştaki artışı göstermektedir. Gerçekten de GLUT1 protein ekspresyonu solid tümörlerin geniş bir dağılımında kötü prognozla bağlantılıdır (19).

Kanseri hücreleri metastaza yol açan anormal proliferasyon için yüksek enerjiye ihtiyaç duyan hücrelerdir. Bu enerji anaerobik glikoliz ve bir adet glukoz molekülünden elde edilen 2 ATP molekülü tarafından sağlanmaktadır. Böylelikle, hipoksik hücrelerde glukoz alımı aşırı şekilde artmış olarak görülür. Hipoksik durumdaki kanseri hücrelerinin proliferasyonu ve sağkalımında düzenleyici olarak görev alan bir diğer yapı olan HIF1 $\alpha$ , HRE'ye (hypoxia responsive recognition element) bağlanır ve GLUT1'i de kapsamak üzere hedef genlerin transkripsiyonunu artırır (18).

GLUT1 hipoksiye hücresel cevapta rol oynadığı bilinen önemli bir hedef mediyatördür. Büyüme faktörleri, insülin, glukoz gibi moleküllerin etkisi, hücreli diferansiyasyon ve transformasyon gibi durumlar; daha da önemlisi hipoksi GLUT1

protein düzeyini değiştirebilir. Kolorektal, ovaryan, endometriyal, gastrik, pulmoner, ürotelyal tümörlerde; ayrıca karaciğer, meme, tiroid ve ampulla vateri neoplazilerinde aberran GLUT1 ekspresyonunun bulunduğu ve bu ekspresyonun prekanseröz lezyonlarda neoplastik progresyonun ya da agresif biyolojik davranışın bir göstergesi olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (20).

### **2.5.2. HIF1 $\alpha$ (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha):**

İnsanda hipoksiyle indüklenen genleri etkinleştiren HIF1 $\alpha$  gen proteini, HIF1 gen ailesinin en iyi bilinen temel elemanlarından biridir. HIF1 $\alpha$  geni; 14q23.2 kromozom bölgesinde bulunan 15 ekzon ve 14 introndan oluşan bir gen dir (21).

HIF1, iskemiye yanıtta anahtar bir erken mediyatördür (22). En solid tümörlerde düşük oksijen konsantrasyonlarına cevap olarak eksprese olur (23). HIF1  $\alpha$  ve  $\beta$  subünitelerinden oluşan bu heterodimer, sağkalımı, glikolizi ve anjiyogenezi teşvik eden güçlü bir transkripsiyon faktörüdür. Transkripsiyonel aktivite birincil olarak, neovaskularizasyonda önemli bir rol oynayan  $\alpha$  subünitesinin oksijenle regüle olan yıkımına bağlıdır (22). HIF1 $\alpha$  pH düzenlemesi, anaerobik glikoliz, anjiyogenez ve hücre proliferasyonu gibi, hipoksi durumlarındaki adaptasyon ve hücre sağkalımıyla ilgili mekanizmalara ilişkin 60 geni aktive eder (23). HIF1 $\alpha$ , hipoksiyle indüklenen genleri aktive ettiği saptanan ilk proteindir (21). Kanserin gelişim ve progresyonunda anahtar bir rol oynar (23).

Hipoksik şartlar altındayken, HIF1 $\alpha$ 'nın  $\beta$  subünitesi ile birleşmesi indüklenir, Ardından bu yapı nükleusa hareket eder ve gen transkripsiyonunu başlatır. Bu HIF1 bağımlı gen ekspresyonunu aktive etmek için, tümör mikroçevresindeki hipoksinin yeterli olduğunu bize göstermektedir (24).

Bazı insan kanserlerinde, muhtemelen intratümöral hipoksi veya genetik alterasyonlar sonucu HIF1 $\alpha$  ve HIF2 $\alpha$ 'nın aşırı ekspresyonu bulunmuştur. Tümör büyüklüğü artarken, tümör kütesinin içerisi yeterli kan damarı oluşturuluncaya kadar giderek hipoksikleşir. Tümör içerisindeki hipoksik koşullar HIF1 stabilitesini ve aktivitesini artırabilir. İmmunohistokimyasal analizler normal dokularda olmamasına karşılık; benign tümörlerde saptanabilir miktarlarda, malign tümörlerde artmış miktarlarda, metastazlarda ise aşırı miktarlarda HIF1 $\alpha$  proteini bulunduğunu



göstermiştir. Araştırmalar HIF1 $\alpha$  geninde bulunan polimorfizmlerin ifadelenen proteinlerin aktivitesinde etkili olabileceğini göstermiştir (21).

Kanserin ilerlemesinde HIF1'in rolüne ait bilgiler, insan kanser biyopsi örnekleri ve deney hayvanları çalışmalarına dayanır. İmmünohistokimyasal analizler ile HIF1'in kolon, meme, akciğer, over, prostat, deri ve mide dâhil olmak üzere birçok insan malign kanserlerinde aşırı ekspresyonu gösterilmiştir. Daha da ötesi, meme ve kolon kanser metastazlarının pek çoğunda HIF1 $\alpha$  birikimi saptanmış ve kötü yaşam sonuçlarıyla ilişkilendirilmiştir. Bu görüş yetersiz HIF1 $\alpha$ 'ya sahip fare ve insan kanser hücre serilerinde yapılan deneylerle desteklenmiştir. HIF1 $\alpha$  protein seviyelerinin çeşitli kanserlerde, yeni tedavi stratejileri planlanırken bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (21).

### **2.5.3. TBX21 (T-box Transcription Factor Protein 21):**

TBX21, Th1/Th2 (Thelper1/Thelper2) polarizasyonunu sağlayan, çok önemli bir transkripsiyonel regülasyon genidir (25). T-bet, T-box transkripsiyon ailesinin bir üyesidir ve Th1 farklılaşma ve fonksiyonları ile ilişkili anahtar transkripsiyon faktörüdür. T-bet'in eksik olduğu T hücreleri Th1 hücrelerine farklılaşamaz. Farklılaşmadan sonra Th1 efektör hücreler IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  gibi makrofaj, NK hücreleri ve CD8+ T hücrelerini uyaran proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterizedir ancak Th1 fonksiyonları dengelenmezse inflamatuvar hastalıklar ve doku hasarı ortaya çıkabilir (26).

Th1/Th2 hücreleri arasındaki dengede esansiyel bir regülatör olarak, Th2 hücrelerinde değil ancak IFN- $\gamma$  üreten Th1 hücrelerinde eksprese olur (25). (Moleküler düzeyde Th1 ve Th2 hücrelerinin farklılaşması için farklı transkripsiyon faktörleri gereklidir. Bunlardan Th1 hücreleri için "T box expressed in T cells" (T-bet) ve Th2 için "c-Maf" ve "GATA-3" en önemlileridir.) Son zamanlarda bir çok yayınlara kanıtlandığı üzere TBX21 geni, konağın kanser gelişimine immun yanıtını düzenlemede rol oynar (25).

### **2.6. SNP (Single Nucleotide Polymorphism):**

Pek çok bireyin kromozomlarında aynı yerdeki DNA dizileri birbirine benzerlik gösterir (27). İnsan genom dizilim çalışmaları her insan genomunda DNA'nın %99.9 benzerlik gösterdiğini kanıtlamıştır. Geriye kalan % 0.1'lik fark,

bireysel genotip ve fenotipik değişikliklerin sorumlusudur (28). Bir genin belli bir lokustaki alternatif kopyalarından her biri allel olarak isimlendirilir. Alleller, yaygın olduğu zaman genel popülasyonda kromozomlarda %1'den daha fazla bulunur; Bunlar da genetik polimorfizm olarak bilinirler. Aksine, alleller %1'den daha az sıklıktaysa, nadir değişimler (rare variants) olarak isimlendirilir. İntronlarda ve genler arasında lokalize olmuş DNA dizilerinde değişim gösteren bazı aileler vardır. Bunlar, herhangi bir genin fonksiyonu için önemsizdir ve sadece direkt DNA analizleri ile belirlenir. Genlerin kodlanan dizi değişimleri farklı protein çeşitliliğine, bu durum da farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olur. Genetik hastalığa neden olan zararlı mutasyonların pek çoğu nadir değişimlerdir. Ağır genetik hastalığa neden olan mutant alleller genetik çeşitliliğin bir sonucudur (27).

Bütün polimorfizmler, DNA dizilerindeki farklılıkların bir sonucu olmasına rağmen, DNA dizilerinin incelenmesinden ziyade, alleller tarafından kodlanan proteinlerdeki çeşitlilik incelenerek, bazı polimorfik lokuslar çalışılmıştır.

DNA analizlerinden çok, değişik proteinler üzerindeki çalışmalar, daha fazla bilgi verici olmaktadır. DNA dizilerinin değişimlerinden daha çok polimorfik allellerin ürünü olan bu proteinler, farklı fenotiplerden sorumludur. Bu nedenle, çevre ile birey arasındaki ilişkiyi, genetik çeşitliliğin nasıl etkilediğini bize açıklayan bu değişik proteinlerdir. Regülatör bölgede polimorfik alleller, genlerin transkripsiyonel regülasyonunu etkileyerek fenotiplerin belirlenmesinde önemli rol oynayabilir.

Herhangi bir bireyin, tüm lokusların yaklaşık %20'sinde allellerin yapısal olarak farklı polipeptidler için heterozigot olabileği gösterilmiş; farklı etnik gruplardan bireyler mukayese edildiği zaman, proteinlerin büyük bir kısmının tespit edilebilen polimorfizmi gösterdiği saptanmıştır. Böylece, kendi enzimlerinin yapılışını ve diğer gen ürünlerini içeren insan türleri içinde, önemli derecede biyokimyasal bireysellik (chemical individuality) vardır. Birçok biyokimyasal yoldaki ürün etkileşim halindedir.

Buradan, sağlık durumu her ne olursa olsun, her bir bireyin genetik olarak kendine özgü kimyasal oluşuma sahip olduğu ve bu nedenle çevreye, beslenmeye ve farmakolojik etkilere kendine özgül cevap vereceği sonucuna varabiliriz (27).

Restriksiyon enzimler, DNA'daki dizileri özgül olarak tanır ve sonuç olarak, genomik DNA'da dizi değişiklikleri, belirli kesim bölgeleri yaratır veya onları yok eder. Bu nedenden dolayı boyutları değişen bir veya birden fazla DNA fragment Southern Blot ve klonlanmış DNA probu ile hibridizasyondan sonra görünür hale gelir.

1970'lerin sonlarında genom analizi için Southern Blot tekniğinin uygulanmasından kısa bir süre sonra, restriksiyon enzim bölgelerinin dağılımının bütün insanlarda tam olarak aynı olmadığı keşfedilmiştir. Bu yöntem ile belirlenen enzim kesim yerlerindeki DNA değişimleri, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) olarak adlandırılır. Farklı fragment uzunlukları, bir DNA lokusunda ko-dominant alleller oluşturur. Bundan dolayı RFLP, Southern Blot ile kolayca araştırılabilir ve farklı fragment uzunlukları genotipin doğrudan yansıması olarak yorumlanabilir. RFLP'ler tek nükleotid değişimlerinden çok, delesyon veya insersiyondan dolayı da olabilir.

Belirli restriksiyon endonükleaz kesilme bölgelerindeki değişimlerden oluşan RFLP'ler tek nükleotid polimorfizmi "Single Nucleotide Polymorphisms" (SNPs) olarak bilinir ve genel polimorfizm sınıflandırılmasının küçük alt grubunu oluşturur. Modern teknikler sadece restriksiyon bölgelerini değiştiren SNP'leri değil, diğer SNP'lerinin belirlenmesinde de kullanılır. SNP'ler çok yoğun genetik haritaların yaratılması için mükemmel belirleyici olarak kullanılabilir. Kompleks hastalıklardan sorumlu belirli genlerin kalıtımını incelemek açısından SNP'lere gereksinim vardır. SNP'lerin birçoğu, belirli pozisyonlarda bulunan iki farklı baza uygun iki allele sahiptir.

SNP'lerin keşfi, belirli genlerin bireysel kopyalarının gerçekten tek olduğunu göstermektedir. Kavram olarak DNA polimorfizmleri yeni bir şey değildir; bunlar protein polimorfizmleri araştırmasında uzun süredir gözlenen genoma ait değişimin basit olarak moleküler bir görünümüdür (27).

Bir hastalığın ortaya çıkışında ve medikal tedaviye verilen yanıtta çevre, yaş, beslenme, yaşam biçimi gibi faktörlere ilaveten, genetik yapıdaki değişikliklerinin de rol oynadığı inkâr edilemez. Bu yüzden toplumların genom yapısındaki varyasyonların ve kişisel gen mutasyonlarının çalışılması kanser oluşum riskinin, ilaç

toksitesisi ve etkinliğinin belirlenmesinde yararlı olmaktadır. SNP'ler insan genomunda en sık bulunan (ortalama her 1000 nükleotitte bir) DNA dizi değişimleridir. Diğer genetik polimorfizm tipleri; değişik uzunlukta ikili ya da üçlü nükleotit tekrarları ve DNA'da eksilme ya da artmaları içerir. İster döngü düzenleyici molekül, isterse yüzlerce hüresel işlevden birinden sorumlu olan herhangi bir genin kodlayıcı bölgesindeki değişiklik, genin ürünü olan fenotipi etkiler. Genin ifadesi ise çoğunlukla genin promotör ya da enhancer gibi düzenleyici bölgeleri ve bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörleri ve diğer yardımcı düzenleyici moleküllerle kontrol edilir. Genin kontrol bölgesindeki nükleotit değişiklikleri ve diğer genlerden oluşturulan ve bu düzenleyici bölgeleri tanıyıp bağlanan düzenleyici proteinlerin genlerinin kontrol ve kodlayıcı DNA bölgesindeki nükleotit dizi değişiklikleri genin ekspresyon düzeyini (ifade edilme düzeyini), bir başka deyişle ürün oluşumu ve miktarını etkiler. Böylece bir genin ekspresyon düzeyi, hem genin kontrol bölgesindeki DNA diziliminin hem de bu bölgeye bağlanan düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin farklılığından dolayı kişiden kişiye değişebilir (28).

Polimorfizmler, tüm insan genetik araştırmalarında anahtar niteliğindeki elementlerdir. Genin muhtelif formlarını veya genomun farklı bölgelerini ayırt edebilmek için kullanılmaktadır. Genetik belirleyiciler tıbbî genetikte kullanım için pratiklik sunar. Bağlantı analiz yolu ile kromozomların belirli bölgelerindeki genlerinin haritalanması, genetik hastalıkta doğum öncesi tanı, genetik hastalıklarda heterozigot taşıyıcıların belirlenmesi, koroner kalp hastalığı, kanser ve diyabet gibi yaygın yetişkin hastalıklara yatkın kişilerin yüksek ve düşük risklerin değerlendirilmesi adlî tıpta ve babalık testinde kullanım ve organ transplantasyonu için doku tiplenmesi tıbbî genetik kapsamı içindedir (27).

Biz bu çalışmada larenks kanseri tanılı hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda, daha önce bir takım hastalıklarla ve malignitelerle ilişkisi gösterilmiş olan, glukoz metabolizması ve hücre içi transportundan sorumlu GLUT1 (*rs710218*), dokunun hipoksiye adaptasyonunu regüle eden HIF1 $\alpha$  (*rs11549465*) ve immün yanıt regülasyonunda rol alan TBX21 (*rs17250932*) gen polimorfizmlerinin sıklığı ile larenks kanseri gelişimi ve tümör büyüklüğü, histolojik grade, lenf nodu ve uzak metastaz ilişkisini araştırmayı amaçladık.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Çalışmaya Dâhil Edilme ve Çalışma Dışı Bırakılma Kriterleri

- En az 30 yaşında olmak,
- En az 20 paket yıl sigara içme öyküsünün olması,
- Hasta grubundakilerin larenks kanseri haricinde hastalığa sahip olmaması,
- Kontrol grubundakilerin herhangi bir hastalığa sahip olmaması ve 1. derece akrabalarında larenks kanseri olmaması.

#### 3.2. Polimorfizm Tespit Yöntemi

##### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden ROCHE (High Pure PCR Template Preparation Kit) izolasyon kiti kullanılarak aşağıdaki şekilde DNA izolasyonu yapılmıştır:

- High Pure PCR Template Preparation kiti ile çalışıldı. (Oda ısısında saklandı.)
- Liyofilize haldeki Proteinase K (pembe kapak) 4,5 ml distile su eklenerek alikotlandı.
- Inhibitor Removal Buffer (siyah kapak) 20 ml etanol eklenerek hazırlandı.
- Wash Buffer (mavi kapak) 80 ml etanol eklenerek hazırlandı.
- 1,5 ml lik eppendorf tüplere 200 µl kan örneği alındı.
- Üzerlerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinase K eklenerek iyice mix edildi.
- 10 dk 72° C'de inkübasyona bırakıldı.
- Daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle mix edildi. (Bu işlem DNA'ların çökmesini sağlamak amacıyla yapıldı.)
- Denek sayısı kadar koleksiyon tüpü çıkartıldı ve her birine filter tüp yerleştirildi.

-Hazırlanan bu karışım koleksiyon tüplerine aktarıldı. 8000x g'de 1 dk santrifüj edildi.

-Koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni koleksiyonlara alındı.

-Her tüpe 500 µl Inhibitör Removal Buffer eklendi (siyah kapak). 8000x g'de 1 dk santrifüj edildi.

-Koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni koleksiyonlara alındı.

-Her tüpe 500 µl Wash Buffer (mavi kapak) eklendi. 8000x g'de 1 dk santrifüj edildi.

-Koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni koleksiyonlara alındı.

-Her tüpe 500 µl Wash Buffer (mavi kapak) eklendi. 8000x g'de 1 dk santrifüj edildi.

-Koleksiyonlardaki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g'de 10 saniye spin yapıldı.

-Koleksiyon tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml'lik eppendorflara alındı.

-Her tüpe önceden eppendorflara bölünerek hazırlanmış ve 72° C'de bekleyen Elution Buffer'dan 200 µl eklendi.

-8000x g'de 1 dk santrifüj yapıldı.

-Filtreli tüpler atıldı ve DNA'lar eppendorfta idi.

-Elution Buffer; filtredeki özel camsı yüzeye bağlanmış olan DNA'yı filtreden ayırdı ve eppendorf tüpte toplamamızı sağladı.

-Bu şekilde DNA örnekleri -20 C° de saklandı.

-İzolasyonun ardından DNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen DNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile kontrol edildi. (İdeal saflıktaki kaliteli DNA'nın A260/A280 absorban oranınının 1,8-2,0 olması beklenir; Genel olarak reaksiyon başına 30-100 ng DNA'nın MSI tespitinde yeterli olacaktır.)

### 3.2.2. Real Time PCR Aşaması

Bu aşama aşağıdaki görsellerde gösterildiği şekilde gerçekleştirildi.



## Resim 1. GLUT1 rs710218 PCR aşaması

### LightSNiP

#### rs710218 GLUT1

##### Preparation of parameter-specific reagents (96 reactions):

One reagent vial contains all primers and probes to run 96 LightCycler® reactions.

Spin vial before opening to ensure the yellow pellet is located at the base of the reaction tube.

Add 100 µl PCR-grade water to each reagent vial, mix the solution (vortex) and spin down.

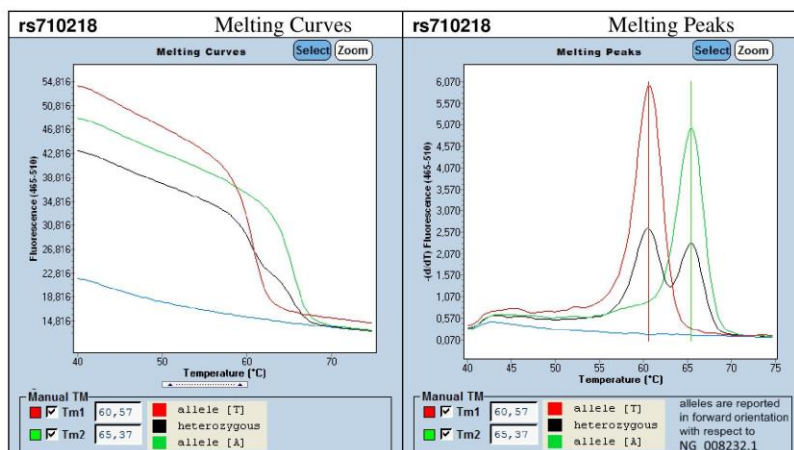
► Use 1 µl Reagent Mix for a 20 µl PCR reaction.

Preparation of the reaction mix:		Settings:
<b>20 µl reaction mixture</b>		<b>LightCycler® 480 Instrument</b>
H <sub>2</sub> O	14.4 – 10.4 µl	<b>Block Type:</b> 384 or 96 <b>Detection Format:</b> Simple Probe LightCycler® 480 Instrument I: 483-533 LightCycler® 480 Instrument II: 465-510
Reagent Mix	1.0 µl	
FastStart DNA Master <sup>(1)</sup>	2.0 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.6 µl	
DNA	1.0 – 5.0 µl (~ 50 ng)	
<b>Final MgCl<sub>2</sub> conc.:</b>	<b>3.0 mM</b>	

<sup>(1)</sup>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)

##### Programming LightCycler® 480 Instrument:

Program:	Denaturation	Cycling				Melting			Cooling
<b>Parameter</b>		<b>Quantification</b>				<b>Melting Curves</b>			<b>None</b>
Analysis Mode	None								None
Cycles	1	45				1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1	
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40	
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30	
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0	
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5	
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None	
Acquisitions [per °C]							3		



**Reference:** CCTTCCCTGTGGTACAAGTCTGCG [A/T] CCTGTACAGATTCTTACCCTCTAC

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=710218](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=710218)



## Resim 2. HIF1 $\alpha$ rs11549465 PCR aşaması

### LightSNiP

#### rs11549465 HIF1A

##### Preparation of parameter-specific reagents (96 reactions):

One reagent vial contains all primers and probes to run 96 LightCycler® reactions.

Spin vial before opening to ensure the yellow pellet is located at the base of the reaction tube.

Add 100  $\mu$ l PCR-grade water to each reagent vial, mix the solution (vortex) and spin down.

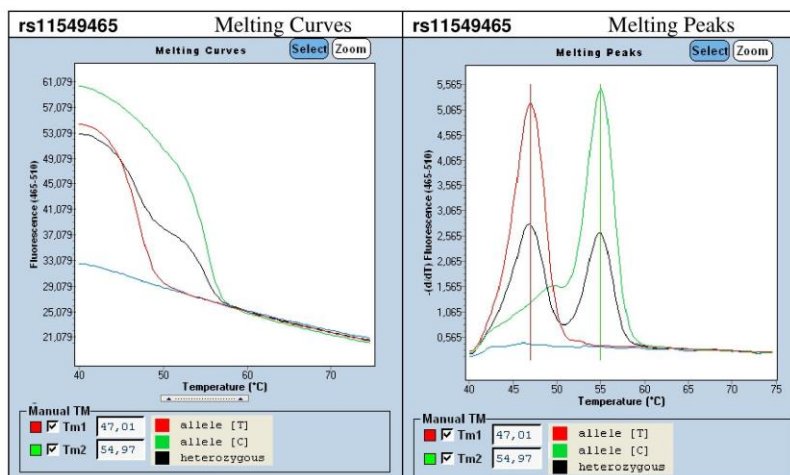
► Use 1  $\mu$ l Reagent Mix for a 20  $\mu$ l PCR reaction.

Preparation of the reaction mix:	Settings:
<b>20 <math>\mu</math>l reaction mixture</b>	<b>LightCycler® 480 Instrument</b>
H <sub>2</sub> O 14.4 – 10.4 $\mu$ l	<b>Block Type:</b> 384 or 96
Reagent Mix 1.0 $\mu$ l	<b>Detection Format:</b> Simple Probe
FastStart DNA Master <sup>(1)</sup> 2.0 $\mu$ l	LightCycler® 480 Instrument I: 483-533
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) 1.6 $\mu$ l	LightCycler® 480 Instrument II: 465-510
DNA 1.0 – 5.0 $\mu$ l (~ 50 ng)	
<b>Final MgCl<sub>2</sub> conc.:</b> 3.0 mM	

<sup>(1)</sup>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)

##### Programming LightCycler® 480 Instrument:

Program:	Denaturation	Cycling				Melting			Cooling
<b>Parameter</b>									
Analysis Mode	None	Quantification				Melting Curves			None
Cycles	1	45				1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1	
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40	
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30	
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0	
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5	
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None	
Acquisitions [per °C]							3		



**Reference:** AGTTACGTTCTTCGATCAGTTGTC A [C/T] CATTAGAAAGCAGTTC CGCAAGCCC

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11549465](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11549465)

LightSNiP rs11549465 HIF1A

Version 150818 © 2015 TIB MOLBIOL

### Resim 3. TBX21 rs17250932 PCR aşaması

#### LightSNiP

#### rs17250932 TBX21

##### Preparation of parameter-specific reagents (96 reactions):

One reagent vial contains all primers and probes to run 96 LightCycler® reactions.

Spin vial before opening to ensure the yellow pellet is located at the base of the reaction tube.

Add 100 µl PCR-grade water to each reagent vial, mix the solution (vortex) and spin down.

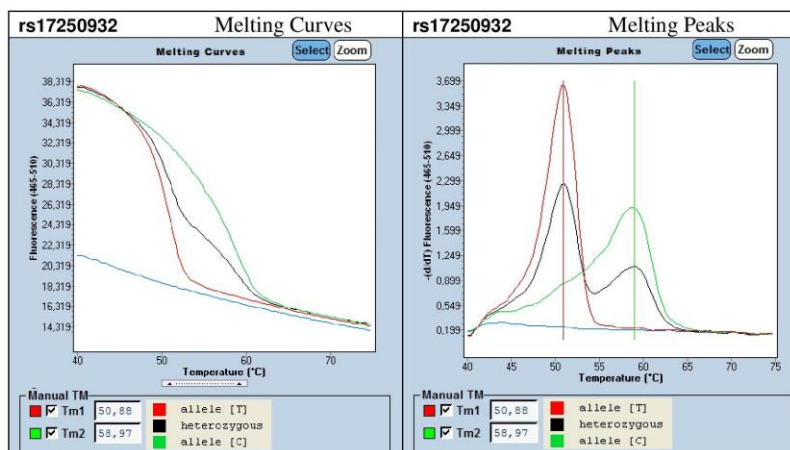
► Use 1 µl Reagent Mix for a 20 µl PCR reaction.

Preparation of the reaction mix:		Settings:
<b>20 µl reaction mixture</b>		<b>LightCycler® 480 Instrument</b>
H <sub>2</sub> O	14.4 – 10.4 µl	<b>Block Type:</b> 384 or 96 <b>Detection Format:</b> Simple Probe LightCycler® 480 Instrument I: 483-533 LightCycler® 480 Instrument II: 465-510
Reagent Mix	1.0 µl	
FastStart DNA Master <sup>(1)</sup>	2.0 µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.6 µl	
DNA	1.0 – 5.0 µl (~ 50 ng)	
<b>Final MgCl<sub>2</sub> conc.:</b>	<b>3.0 mM</b>	

<sup>(1)</sup>LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)

##### Programming LightCycler® 480 Instrument:

Program:	Denaturation	Cycling				Melting			Cooling
<b>Parameter</b>		<b>Quantification</b>				<b>Melting Curves</b>			<b>None</b>
Analysis Mode	None								None
Cycles	1	45				1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1	
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40	
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30	
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0	
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5	
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None	
Acquisitions [per °C]							3		



Reference: TTTATATAAATTATATATTTGTGCA[C/T]GTGTGCAAAAGACAGACAGAGAG

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=17250932](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=17250932)

### 3.2.3. Analiz

LightCycler 480 yazılımı ile data analizi Tm calling modunda yapıldı ve her olgunun Tm farkı olup olmadığına bakıldı. Tm farkı olan örnekler resimde belirtildiği gibi allelleri olarak belirlendi. Daha sonra LightCycler 480 yazılımı ile Melting Curve Genotyping analizi yapılarak bu allel grupları her örnek için belirlendi.

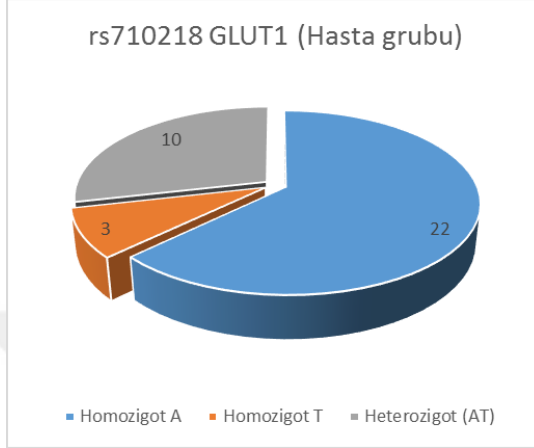
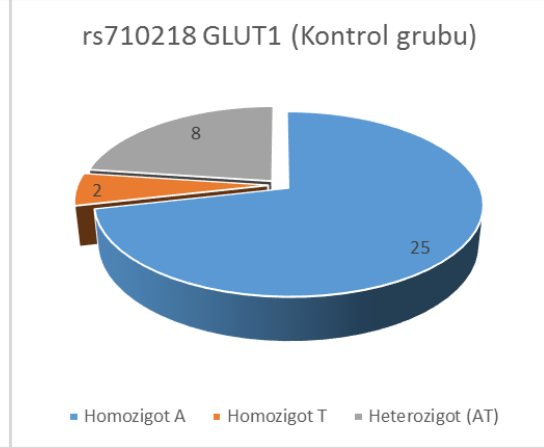
### 3.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler, şekil 1,2,3,4,5 ve 6 'da da grafiksel olarak gösterildiği üzere hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınan numunelerde bakılan üç adet SNP'nin varyantları değerlendirilerek yapıldı. Bununla beraber daha önceden elde edilen, hasta grubundaki tümör boyutu, tümör evresi, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz varlığı gibi ölçütler de istatistiksel olarak karşılaştırıldı. İstatistiksel verilerin elde edilmesi için SPSS for Windows 15.0 paket programı kullanıldı. Değerlendirmeler Student T ve Ki Kare testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

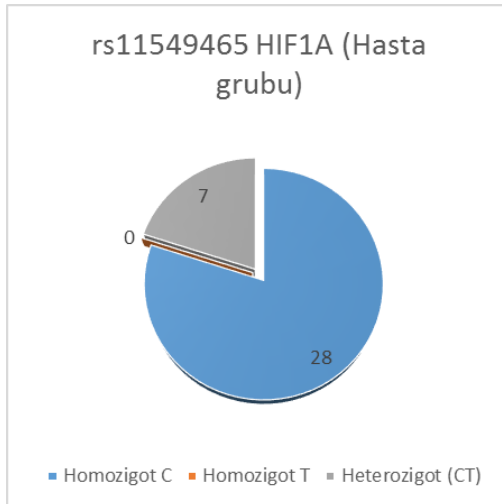
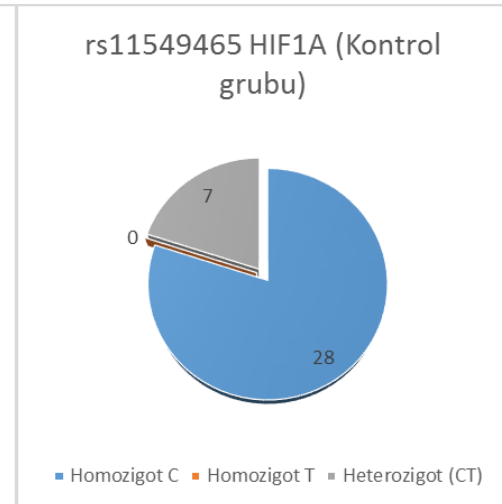
## 4. BULGULAR

Hasta grubunda ortalama yaş 64,62 iken (SD: 10,59), sağlıklı kontrol grubunda 60,11 idi (SD:13,97). Sigara paket yıl ortalaması ise hasta grubunda 48,28 iken, kontrol grubunda 36,57 idi. Hastaların yaşları ve sigara içme süreleri arasında fark yoktu ( $p=0.132$ ,  $p=0.062$ ).

GLUT1 *rs710218* polimorfizminin değerlendirildiği çalışmamızda 35 hastanın 22'sinde bu polimorfizmin AA varyantı mevcut iken, 13 hastada AT (10 hasta) veya homozigot T (3 hasta) varyantı mevcut idi. Kontrol grubundaki 35 bireyin 25'inde homozigot A varyantı varken, 8 kişide AT, 2 kişide ise homozigot olan TT varyantı olduğu saptandı. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırıldığı analizde AA varyant ve non-AA varyant (AT ve TT) oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ( $p=0,611$ ). Aynı zamanda her iki grup arasında A ve T allelleri bulundurma oranları açısından anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

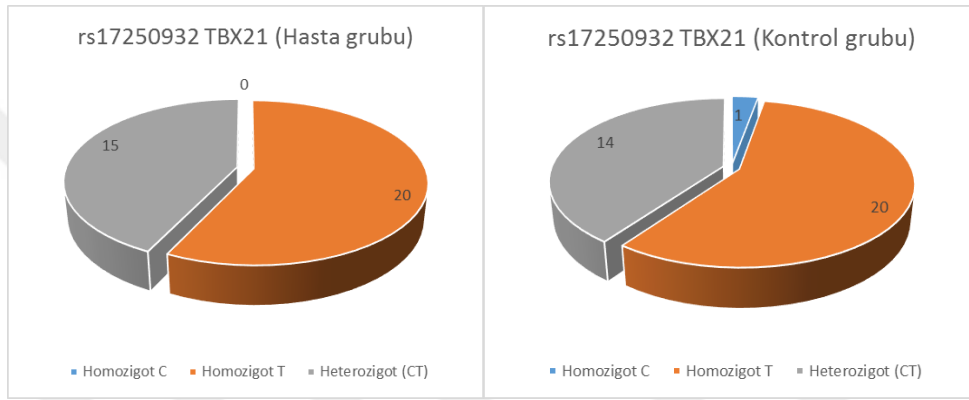
Şekil 1. *rs710218* hasta genotip dağılımıŞekil 2. *rs710218* kontrol genotip dağılımı

İncelenen bir diğer polimorfizm olan HIF1 $\alpha$  *rs11549465*'ye bakıldığında, hasta ve kontrol gruplarında homozigot TT varyantı olmadığı görüldü. Homozigot C ve CT varyantlarının karşılaştırıldığı grupların her ikisinde de, 28 CC varyantı saptanırken, CT'ye sahip birey sayısı 7 olarak izlendi ( $p=1,0$ ).

Şekil 3. *rs11549465* hasta genotip dağılımıŞekil 4. *rs11549465* kontrol genotip dağılımı

TBX21 *rs17250932* polimorfizmine baktığımızda ise, her iki grupta da baskın olan TT varyantı ile non-TT varyantların (CT ve CC) oranı karşılaştırıldı. Hasta grubunda 20 homozigot T varyantına karşılık, 15 adet CT varyantlı birey olduğu görülürken, bu grupta hiç homozigot C varyantı olmadığı görüldü. Kontrol grubunda yine 20 adet homozigot T saptanırken, kalan 15 kişiden 14'ünde CT ve yalnızca bir kişide CC varyantı olduğu saptandı. TT ve non-TT varyantlara sahip olma açısından istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmedi ( $p=1$ ). Yine C ve T allellere sahip olma açısından da iki grubun benzer olduğu görüldü.

**Şekil 5.** *rs17250932* hasta genotip dağılımı **Şekil 6.** *rs17250932* kontrol genotip dağılımı



Larenks kanseri tanılı hasta grubundaki 3 adet hasta yeni tanı almıştı ve opere edilmemişti. Bu yüzden SNP ile tümör boyutu ve evresi arasındaki ilişki, diğer 32 hasta üzerinde değerlendirildi.

Hasta grubu GLUT1 *rs710218* polimorfik varyantları ve tümör boyutu arasındaki ilişki incelenirken, dominant grup olan AA homozigot varyantı ile non-AA varyantlarını içeren grup karşılaştırıldı. AA varyantı içeren gruptaki 19 hastanın 8'inde en büyük tümör çapı 3 cm ve üzerinde saptanırken, 13 adet kombine non-AA varyantlı hastanın 3'ünde 3 cm ve üzeri tümör çapı olduğu gözlemlendi. Bu açıdan iki grup arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ( $p=0,45$ ). Genotip ve tümör evresi arasındaki ilişkiye bakıldığında, ilk gruptaki (AA) 21 hastanın 11'inde ileri evre tümör (T3/T4) varken, non-AA (AA+AT) gruptaki 11 hastanın 5'inde ileri evre tümör olduğu görüldü. Bu açıdan da gruplar arasında istatistiksel bir fark olmadığı görüldü ( $p=1$ ).

Aynı şekilde HIF1 $\alpha$  *rs11549465* polimorfizmi ile tümör boyutu arasındaki ilişkide, homozigot C veya CT varyantlarına sahip olma ve tümör boyut ilişkisi incelendi. 3 cm ve üzeri tümör saptanma oranı, ilk gruptaki (CC) 25 kişide 9 iken, ikinci grupta (CT) 7 kişide 2 olarak görüldü ( $p=1$ ). Bu iki grupta da polimorfizmin tümör boyutunda olduğu gibi, tümör evresi üzerinde de etkisinin olmadığı görüldü.

Son olarak TBX21 *rs17250932* SNP'si ve tümörün boyut ve evre özelliklerinin ilişkisi irdelendi. TT homozigot varyantına sahip 19 hastadan 8'inde 3 cm ve üzeri tümör çapı saptanırken, bu oranın CT heterozigot varyantına sahip grupta 13 hastada 3 kişi şeklinde olduğu gözlemlendi. ( $p=0,45$ ) Tümör evresi açısından incelenen gruplarda ileri evre tümör oranı sırasıyla 18 kişide 10 ve 14 kişide 6 olarak saptandı. ( $p=0,722$ )

İncelenen 35 larenks kanseri tanılı hastanın 3'ü yeni tanılı hasta olup, diğer 32 hastanın yalnız 7'sinde lenf nodu metastazı saptanırken bu hastaların hiç birinde uzak metastaz izlenmedi.

## 5. TARTIŞMA

Kanser gelişiminde birçok faktör rol oynamaktadır. Bunlar arasında çevresel faktörler, beslenme ile birlikte genetik faktörler sayılmaktadır. Birçok kanserin genetik yönü henüz aydınlatılmamış olmakla birlikte bazı genlerin varlığının direkt olarak kanseri önlemediği, bazı kritik genlerdeki aminoasit içeriklerinin varlığı ve yer değişimlerinin, üretilen enzimi ve proteini farklılaştırarak kanseri önlediği veya indüklediği, genel kabul gören görüştür. Bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesi "genetik polimorfizm" olarak adlandırılmaktadır. Bu polimorfik yapının kanser gelişiminde etkin olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda bu bağlantıyı ortaya koymak için çok farklı moleküller ve polimorfizmler ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Literatürde GLUT1 GLUT3, HIF1, TBX, MnSOD, GPx1 gibi yapılara yönelik ve bunlara ait polimorfizm ve diğer kanserler arasındaki bağlantıyı ortaya koymak için son yıllarda çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bunların büyük çoğunluğu KBB ile ilgili olmayan çalışmalardır. Bu çalışmalarda çok sayıda enzim üretiminde genetik polimorfizm araştırılmıştır. Öte yandan larenks kanser

gelişiminde gen ve gen polimorfizm etkisini inceleyen literatürde çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Üzerinde çalıştığımız GLUT1, HIF1 $\alpha$  ve TBX21 ile yapılan hemen tüm polimorfizm araştırmalarını tartışmamızda ele aldık.

Katarzyna Starska ve arkadaşlarının 2014 yılında GLUT proteini ile ilgili yaptıkları bir çalışmada 2 adet GLUT proteininin ve bunların ekspresyon oranlarının kanser davranışı ile ilişkisini irdelemiştir. Larenks SCC'de non-kanseröz mukozaya göre GLUT1 ve HIF1 $\alpha$  için daha yüksek mRNA/protein düzeyleri elde edilmiştir. SLC2A1 ve SLC2A3 genlerinin her ikisi de, ilişkili GLUT1 ve GLUT3 proteinleri gibi, laringeal kanserin davranışını etkileyebilmektedir. Ortaya konan bulgular, tümör agresifliğini belirlemede GLUT'ların ekspresyonunun önemine işaret etmektedir. Ayrıca yazarlar, HIF1 $\alpha$  ile TNM, TFG (tumor front grading) skalası, invazyon derinliği, tümör rekürrensi ve survey arasında ilişki olduğunu saptamışlardır (29).

Aynalı ve arkadaşlarının Süleyman Demirel Üniversitesi'nde 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada MnSOD, GPx1 ve CAT-262 genlerinin polimorfizmleri incelenmiştir. Bu çalışmada yaş, sigara içme süresi ve karsinom gelişme sıklığı gibi parametreler açısından, sigara içen larenks kanserli grup ve sigara içen kontrol grubu karşılaştırılmıştır. MnSOD'un Val16Ala Homozigot AA genotipi kanser grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede sık bulunmuştur (%93'e %13). Aynı şekilde MnSOD Val16Ala AV genotipi kontrol grubuna göre daha sık bulunmuştur (%87'e %8). Değerlendirilen diğer polimorfizmler açısından ise anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu çalışma, MnSOD Val16Ala gen polimorfizminin, sigara içenlerde laringeal kanser gelişimine katkı sağlayabileceğini göstermiştir (30). Biz de çalışmamızda, benzer şekilde her ikisi de sigara içen larenks kanserli hasta grubu ve kontrol grubunda üç adet genin (GLUT1, HIF1 $\alpha$  ve TBX21) birer polimorfizmini karşılaştırdık. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptamadık.

Mera-Menéndez ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları, glottik larenks kanseri olan hastalar ve sağlıklı gönüllülerin katıldığı çalışmada, HIF1 $\alpha$ 'nın C1772T ve G1790A polimorfik varyantları karşılaştırılmıştır. İleri evre tümörler (T3/T4) TT genotipiyle ilişkili bulunmuştur. (T4 tümörlerin %75'inde mevcut olduğu görülmüştür.) Nodal metastazı olan hastaların da TT ve GA varyantlarını anlamlı

oranda daha yüksek taşıdıkları gösterilmiştir. Sonuç olarak TT ve GA varyantlarının varlığının lenf nodu metastazıyla, TT varyantının varlığının ise daha büyük tümör boyutuyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (23). Çalışmamızdaki hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de CC homozigot varyantı %80 oranında görüldü. TT homozigot varyantı ise iki grupta da izlenmedi. Belirtilen varyantların incelendiği hasta ve kontrol grubu arasında polimorfizm varyantları ve kanser evresi yönünden bir karşılaştırma yapılmış ancak belirgin bir farklılık izlenmemiştir.

Konac ve arkadaşları, bizim çalışmamıza benzer olarak, *rs11549465* dâhil olmak üzere 7 adet HIF1 $\alpha$  polimorfizmini, Türk popülasyonundaki akciğer kanseri olan hastalarda araştırmıştır. İncelenen polimorfizmlerin genotip frekans dağılımı açısından akciğer kanserli grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. *rs11549465* (bizim de incelediğimiz polimorfizm) ile akciğer kanser gelişimi arasında ilişki saptanmamıştır. Ayrıca genotip ve klinikopatolojik karakteristikler arasında da önemli bir ilişki bulunamamıştır. Bu bulgular, HIF1 $\alpha$  gen polimorfizmlerinin akciğer kanseri yatkınlığıyla ilişkili olmadığına işaret etmektedir (31). Biz de çalışmamızda bahsedilen *rs11549465* polimorfizminin larenks kanseri gelişimiyle bir bağlantısının olmadığını tespit ettik.

Larenks kanser gelişimi ile ilgili olabileceğini düşündüğümüz ve çalıştığımız polimorfizmler *rs710218*, *rs11549465* ve *rs17250932* konusunda birçok değişik gastrointestinal sistem kanser tipi üzerine de çalışmalar yapılmıştır. Huihui Li ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada özofagus skuamöz hücreli karsinomu olan hastalarda, TBX21'in *rs17250932* (-1514T/C) de olmak üzere iki adet polimorfizmi ile lenf nodu metastazı ve uzak metastaz arasındaki ilişki araştırılmış, sonuçlar anlamlı bulunmuştur. Özellikle TBX21 geninden elde edilen ACC, ACT ve ATC haplotipleri yüksek riskli Çin popülasyonunda özofagus skuamöz hücreli karsinomuna olan yatkınlığı arttırmaktadır (25).

Le-Hui Zhang ve arkadaşlarının 2012 yılına ait bir çalışmada, bir TBX21 polimorfizmi olan T-1993C (*rs4794067*)'nin gastrik kanser riski üzerine etkisi incelenmiştir. Polimorfizm ile lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ilişkisi anlamlı olarak saptanmıştır (32).



Thomas Amann ve arkadaşlarının GLUT1 polimorfizmi (*rs710218*) ile HCC gelişim ilişkisini irdeledikleri çalışmada, polimorfizm HCC gelişimi için daha yüksek riskle ilişkili bulunmamıştır. Bu bahsedilen genetik polimorfizmin karaciğerde tümör gelişim riski üzerine etkisi olmadığı görülmüştür (19). Liu ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada, HBV ilişkili HCC'li 157 hastada iki adet polimorfizmi incelemiştir. HIF1 $\alpha$ 'nın incelenen *rs11549465* ve *rs11549467* polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı genotip ve allel farklılığının olmadığını rapor etmişlerdir (33).

Knechtel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada P582S (*rs11549465*) ve A588T (*rs11549467*) polimorfizmlerinin kolorektal kanser gelişimiyle anlamlı bağlantısının olmadığı, ancak HIF1 $\alpha$  A588T (*rs11549467*) polimorfizmi ile tümör lokalizasyonu ve tümör boyutu arasında bir korrelasyonun olduğu gösterilmiştir. Buradan HIF1 $\alpha$  genindeki polimorfizmlerin kolorektal kanser riskini değiştirmede sadece hastalığın klinik olarak agresif seyri ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (34). Xu ve arkadaşları, 2013 yılında yaptığı, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* gen polimorfizmi ile gastrointestinal trakt kanseri arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmada C varyant polimorfizmi ile, gastrointestinal trakt kanser riski arasında bağlantı bulmuşlardır. Bu riskin Asya popülasyonunda mevcut olduğunu, ancak beyaz ırk için aynı riskin izlenmediği görüşünü rapor etmişlerdir (35). Bu çalışma ile benzer olarak bizim çalışmamızda, hasta grubu ile kontrol grubu arasında C varyant polimorfizmi açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Öte yandan Ruiz-Tovar ve arkadaşlarının 2012 yılında pankreas kanseri olan 59 hasta ile ilgili yaptıkları çalışmada, HIF1 $\alpha$ 'nın iki polimorfizmi ve timidilat sentaz'ın üç polimorfizmine bakılmış, bunların pankreas kanserinin prognozu üzerindeki etkinliği incelenmiştir. Yazarlar timidilat sentaz polimorfizmlerinden birisinin yanısıra HIF1 $\alpha$ 'nın incelenen her iki polimorfizminin (C1772T (*rs11549465*) ve G1790A (*rs11549467*)) TT ve AA genotiplerinin pankreatik kanser gelişimi ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (36).

Aynı şekilde genitoüriner sisteme yönelik olarak, bizim de çalışmamızda ele aldığımız genlerin bir takım polimorfizmleri ile ilgili değişik çalışmalar mevcuttur. Florian Grabellus ve arkadaşları GLUT1 XbaI polimorfizminin bir varyantını (GG),

meme kanserinde, artmış 18FDG tutulumu ile ilişkili bulmuşlardır. Dahası bu genotip, artmış tümör proliferasyonu ile pozitif ilişkili saptanmıştır. Bununla uyumlu olarak, bu genotipin grade 1 karsinomlarda mevcut olmadığı ve daha yüksek malignensi ile artan düzeyde ilişkili olduğu gözlenmiştir. Böylelikle yazarlar bu polimorfizmin meme kanserinde, proliferasyon ile bağlantılı prognostik bir faktör olduğunu iddia etmişlerdir (37). Bu çalışmanın aksine Valentina Bravatà ve arkadaşları (2013), yapmış oldukları bir çalışmada meme kanserli hastalarda SUVmax ve SUVpvc kullanılarak 18FDG PET-BT tutulumunun iki adet GLUT1 (*rs841853* ve *rs710218*); iki adet HIF1 $\alpha$  (*rs11549465* ve *rs11549467*) olmak üzere dokuz SNP ile ilişkisini araştırmış ve anlamlı bir bulgu elde edememişlerdir (38). Biz de çalışmamızda larenks kanserli olgularda GLUT1 polimorfizmi (*rs710218*) ile kanser progresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamadık.

Yine 2014 yılında, Fu ve arkadaşlarına ait olan HIF1 $\alpha$ 'nın üç SNP'si (*rs11549465*, *rs11549467* ve *rs2057482*) ile serviks kanseri riskinin ilişkisini irdeleyen yayında, *rs2057482*'in CC genotipinin belirgin şekilde artmış serviks kanseri ile ilişkili olduğu görülmüştür ki bu serviks kanserinde güvenilir bir prediktif faktör olarak hizmet edebilir. Diğer iki polimorfizmle (*rs11549465*, *rs11549467*) anlamlı bir bağ görülememiştir (39).

Prostat ve böbrek kanserlerinde HIF1 $\alpha$  polimorfizm varlığı konusunda değişik çalışmalar mevcuttur. Pu Li ve arkadaşları, 2012 yılında yaptıkları çalışmada HIF1 $\alpha$ 'nın *rs11549465*, *rs11549467* ve *rs2057482* olmak üzere üç adet SNP'si ile çalışmışlardır. *rs11549467* GG genotipiyle karşılaştırıldığında GA ve AA varyant genotiplerinin önemli ölçüde artmış prostat kanser riski taşıdığı ortaya konmuştur (40). Ancak çalışmamızda bakılan *rs11549465* polimorfizmi ile larenks kanser riski arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Fraga ve arkadaşlarının 2014'te ortaya koydukları bir çalışmada, HIF1 $\alpha$  1772 C>T (*rs11549465*) polimorfizmi değerlendirilmiş olup, bu çalışmaya göre ADT (Androgen Deprivation Therapy) altındaki HIF1 $\alpha$  +1772 T- alleli taşıyan prostat kanserli hastalar uzak metastaz geliştirme açısından artmış riske sahiptirler. Bu daha agresif kanser davranışı demektir ve HIF1 $\alpha$ 'nın prostat kanseri progresyonuyla ve ADT direnciyle ilişkisini desteklemektedir. Ancak çalışmaya göre bu polimorfizm, prostat kanser teşhisi için artmış risk teşkil etmemektedir (41). Bizim çalışmamızda polimorfizm ile kanserde

progresyon ve metastaz gibi agresif davranış özelliklerini irdelemek için yeterli parametremiz mevcut değildi.

Öte yandan 2017 yılında Avelino Fraga ve arkadaşlarının yaptığı, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* (1772 C > T) ile birlikte üç adet genin daha polimorfizmlerinin değerlendirildiği güncel çalışmada (2017), hedef polimorfizmlerin genetik dağılımları, nodüler prostat hiperplazisi ve prostat karsinomu arasında benzer bulunmuştur. Aynı çalışmada, bir HIF1 $\alpha$ /LOX düzenleyici mekanizmasının, tümör hücreleri hipoksiye adapte olurken sinerjistik olarak tümör formasyonunu besleyebileceği öne sürülmektedir (42). Qin ve arkadaşlarının 2011 yılına ait bir çalışmasında, bir tümör süpresör geni olan VHL'deki bir polimorfizm ile birlikte HIF1 $\alpha$ 'daki *rs11549465*, *rs11549467*, ve *rs2057482* olmak üzere üç adet polimorfizme bakılmıştır ve bunların renal hücreli karsinom gelişimi ve prognozuyla ilişkisi değerlendirilmiştir. HIF1 $\alpha$ 'nın *rs2057482* polimorfizmi ve daha az lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmiştir. Değerlendirilen dört adet polimorfizmin daha çok varyant allelini taşıyan bireylerde daha az sıklıkta lenf nodu metastazı ve daha düşük klinik evreli tümör olduğu anlaşılmıştır. İlginç olarak, daha çok polimorfik varyanta sahip hastalarda, sahip olmayanlara göre daha fazla sağkalım olduğu belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada HIF1 $\alpha$  genotip dağılımı açısından RCC hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Daha önceki çalışmalardan farklı olarak *rs11549465* genotip dağılımında farklı evreler arasında önemli farklılıklar görülmemiştir (43). Lessi ve arkadaşlarının 2014'te yapmış oldukları bir çalışmada, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* polimorfizminin CC varyantı ve tümör-spesifik sağkalım arasında anlamlı bir bağ olduğu görülmüştür. Aynı çalışma, RCC'de VHL/HIF1 $\alpha$  yolağının rolünü aydınlatmakta ve erken evre berrak hücreli RCC'de moleküler heterojeniteyi desteklemektedir. Daha da önemlisi, HIF1 $\alpha$  C1772T (*rs11549465*) polimorfizminin berrak hücreli RCC progresyonuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (44).

Bazı enzimlerdeki polimorfizmlerin sadece kanser gelişimi ile değil, yaşam tarzı hastalıklarının ve diğer malign olmayan hastalıkların gelişimi ile arasındaki bağlantı değişik çalışmalarda ortaya konmuştur. Yanagisawa ve arkadaşlarının yaptıkları bir yayında yaşam tarzına bağlı hastalıklar ile bizim üzerinde çalıştığımız GLUT1 de dâhil, bir grup polimorfizmin ilişkisi irdelenmiştir. Tayland'lı erkeklerde

en çok GLUT1'e ait polimorfizm, vücut yağ oranıyla ilişkili bulunmuştur. Bu, tek nükleotid polimorfizmlerinin yalnızca maligniteler ve sistemik hastalıklarla değil, aynı zamanda onlara yatkınlık sağlayan vücut özellikleriyle de ilişkili olabileceğini göstermektedir (45). Pontiroli ve arkadaşlarına ait eski bir çalışmada (1996), çeşitli ırklarda GLUT1 ve GLUT4 polimorfizmlerinin allel ve genotip frekansları ve bunların Tip 2 Diyabetes Mellitus yatkınlığıyla ilişkisi değerlendirilmiştir. GLUT1 Xbal polimorfizmi için pozitif sonuçlar elde edilmiş ve bu ilişki, yalnızca aşırı kilolu/obez kadınlarda önemli bulunmuştur (46). Yine Rufino ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada GLUT1 Xbal gen polimorfizmini, vasküler kalsifikasyonlarla ilişkili bulmuşlardır (47).

López-Reyes ve arkadaşlarına ait olan bir yayında (2014), HIF1 $\alpha$ 'nın 3 polimorfizmi (*rs11549465*, *rs11549467*, *rs2057482*) değerlendirilmiş olup *rs2057482* T alleli azalmış santral obezite, hipertansiyon, hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi riskleri ve artmış Tip 2 Diyabetes Mellitus riski ile ilintili bulunmuştur. Sonuçlar HIF1 $\alpha$  *rs2057482* polimorfizminin koroner arter hastalığı geliştirme riski içerdiğini ve bazı metabolik parametreler ve kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkili olduğunu göstermektedir (48). Geza Nagy ve arkadaşlarına (2009) ait bir çalışmada *rs11549465* polimorfizminin T içeren genotip grubunun (CT ve TT), kontrol grubunda hasta grubuna göre önemli ölçüde sık görüldüğü saptanmıştır. Bu sonucun ayrı ayrı Tip 1 DM ve Tip 2 DM grupları için de geçerli olduğu gözlenmiştir. Allel ilişkili analiz de, tıpkı genotipte olduğu gibi, T allelinin kontrol grubunda hasta grubuna göre yüksek frekansta olduğu sonuçlar vermiştir (22).

Pichu ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada HIF1 $\alpha$  genindeki *rs11549465* polimorfizmi, diyabetik ayak ülseri olan ve olmayan diyabetik iki grup ve kontrol grubu arasında karşılaştırılmıştır. T alleli varlığının, diyabeti olan iki grupta, kontrol grubuna göre anlamlı oranda artmış olduğu görülmüştür. İlginç şekilde HIF1 $\alpha$  ekspresyonu, diyabetik ayak ülseri olan DM grubunda, ayak ülseri olmayan DM grubuna göre azalmış olarak görülmüştür ki bu ayak ülserinin patogenezinde olası rolüne işaret etmektedir (49).

Yine benzer olarak, 2012 yılında Strauss ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada HIF1 $\alpha$  1772C>T polimorfizmi (*rs11549465*) ile sigara içme ve abdominal

aort anevrizmasının (AAA) ilişkisi incelenmiştir. Ayrıca AAA'lı hastalarda bu faktörlerin PAH (periferik arter hastalığı; femoro-popliteal veya aorto-iliak oklüzyon) ile ilişkisine bakılmıştır. Allel frekansı, AAA'lı grupta, kontrol grubuna benzer saptanırken, CT ve TT genotiplerinin ve tütün dumanına maruziyetin birlikte var olmasının AAA gelişiminde güçlü bir çoğaltıcı etkisi bulunmaktadır. T allelini taşıyan içicilerin oranı, ileri düzey PAH hastalarında, diğer AAA hastalarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Sonuç itibarıyla, bu polimorfizmdeki allel değişiminin, sigara içmeyle oluşan AAA riskini arttırdığı ve sigara içenlerde hastalığın eşlik eden ağır PAH'ın da olduğu daha kompleks bir fenotipinin gelişimine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Bu da HIF1 $\alpha$  polimorfizmlerinin yalnızca tümör davranışlarıyla değil, aynı zamanda tümör dışı patolojilerde de hastalığın klinik tablosunu belirlemede önemli olduğuna işaret etmektedir (50).

Bahadori ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada anjiyogenezdeki anahtar düzenleyici olan, inflamasyonda görev alan HIF1 $\alpha$ 'nın *rs11549465* ve *rs11549467* olmak üzere iki polimorfizminin PAH ile ilişkisi irdelenmiştir. Her iki polimorfizm için de hasta ve kontrol grupları arasındaki farklar anlamlı bulunmamıştır (51).

Hlatky MA ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada HIF1 $\alpha$ 'daki üç polimorfizm (*rs11549465*, *rs1087314* ve *rs41508050*), stabil anjinalı hastalarla, MI'lı hastalara nazaran önemli derecede ilişkili bulunmuştur. Böylelikle koroner arter hastalığının başlangıç klinik prezentasyonu olarak, HIF1 $\alpha$  polimorfizminin, akut MI'dan ziyade stabil anjina pektoris gelişimiyle ilişkili olduğu söylenebilir (52).

Andraweera ve arkadaşlarının 2014 yılına ait bir çalışmasında HIF1 $\alpha$  *rs11549465* polimorfizmi ile erken ve geç başlangıçlı preeklampsi ilişkisi irdelenmiştir. Sonuçlar geç başlangıçlı preeklampside ve normal gebelikte HIF1 $\alpha$  *rs11549465* T allelinin koruyucu etkisini kanıtlamaktadır (53).

Zheng ve arkadaşlarına ait bir çalışmada HIF1 $\alpha$ 'nın *rs2783778*, *rs714872*, *rs7143164*, *rs10873142*; *rs2301113*, *rs11549465* ve *rs2057482* olmak üzere 7 polimorfizmi ile hemodiyaliz hastalarında iskemi/hipoksi ilişkili durumlar arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Hipoksi olan ve olmayan grup arasında genotip dağılımı açısından önemli farklılık saptanmamıştır. Ancak bir polimorfik varyant, diyaliz

hastalarında hem akut MI ile, hem de sık intradialitik hipotansiyonla ilişkili bulunmuştur (54).

Wipff ve arkadaşlarının Avrupalı beyaz ırka mensup deneklerde yaptıkları, HIF1 $\alpha$  geninin rs12434438, rs1957757, ve rs11549465 olmak üzere üç adet polimorfizmi ile sistemik skleroz gelişimi arasındaki ilişkiyi irdeleyen çalışmada ilk polimorfizmin en az bir G alleli taşıyan genotiplerinin sıklığı sistemik sklerozda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (55). Bizim çalışmamızda incelediğimiz rs11549465 de olmak üzere test edilen diğer iki SNP’de anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir.

Javier Fernández-Torres ve arkadaşlarının 2015 yılında yayınladıkları bir çalışmada, rs11549465 polimorfizminin CC genotipinin, diz osteoartriti olan hastalarda önemli ölçüde artmış olduğu ortaya konulmuştur. CT genotipi ve T alleli ise hasta grupta azalmış frekansta izlenmiştir. Bu çalışma, HIF1 $\alpha$  rs11549465 polimorfizm varlığının eklem kıkırdak kaybında koruyucu bir rol oynadığını öne sürmektedir (56).

Zhu ve arkadaşlarına ait bir yayında (2015), TBX21’in 3 SNP’si (rs17250932, rs2074190, rs4794067) çalışılmıştır. rs4794067’deki C alleli, kronik hepatit C hastalarında, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Yine TAC haplotipinin kronik hepatit C taşıyıcısı hastalarla sağlıklılar arasında, anlamlı şekilde farklı bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlarla TBX21 polimorfizmlerinin, bu hastalığın etyolojisiyle ilişkili olabildiği öne sürülmektedir (57).

Bir başka çalışmada (Morita ve arkadaşları, 2012), TBX21 -1514T/C (rs17250932) ve -1993T/C polimorfizmlerinin T allellerinin, kontrolü sağlanamayan Graves hastalarında, remisyondaki Graves hastalarına göre daha sık olduğu saptanmıştır. Buna göre, TBX21’deki fonksiyonel polimorfizmlerin otoimmün tiroid hastalıklarının gelişimi ve Graves’in prognozuyla ilişkili olduğu öne sürülmektedir (58).

You ve arkadaşlarına ait olan bir çalışmada, TBX21 rs4794067 ve rs17250932 polimorfizmlerinin sıklığı, SLE’li hastalarda kontrol grubundakilere göre belirgin şekilde yüksek saptanmıştır. Bu pozisyonlarındaki C allel sıklığının

hasta grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür. Zira CC/CC homozigot haplotipli bireylerde SLE'ye yatkınlık azalmış olarak görülmektedir. Mevcut çalışmada TBX21 polimorfizminde, belli bir haplotipin SLE'ye olan genetik yatkınlık için koruyucu bir faktör olabileceği öne sürülmektedir (59).

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan da anlaşıldığı üzere gen polimorfizm bağlantısı sadece malign hastalıklarda değil, malign olmayan hastalıklar üzerinde de çok çalışılmış, hatta malign olanlara göre çok daha güçlü bir ilinti ortaya konmuştur. O nedenle bundan sonra kansere spesifik bir durum olmayan bu ve benzeri polimorfizm konusunda yapılacak çalışmaların literatüre katkısı olmayacağı kanaatindeyiz. Çünkü bugüne kadar yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar umut vadetmemektedir.

## 6. SONUÇ

Çalışmamızda larenks kanserinde GLUT1 *rs710218*, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* ve TBX21 *rs17250932* polimorfizmlerinin etkili olmadığı kanısına varılmıştır.

Larenks kanserlerinde araştırdığımız GLUT1, HIF1 $\alpha$  ve TBX21 polimorfizmleri, literatürde çok değişik malign ve malign olmayan hastalıklarda araştırılmıştır. Bir kısmında bir bağlantı bulunmuş, bir kısmında bulunamamıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre larenks kanserinde GLUT1, HIF1 $\alpha$  ve TBX21 polimorfizminin etkili olduğuna dair kesin bir bulgu yoktur. Aradaki bağlantının ortaya konması için çok sayıda geniş serili değişik enzim, protein ve polimorfizm çalışmaları planlanabilir.

## ÖZET

### SİGARA İÇEN, LARENKS KANSERİ OLAN VE OLMAYAN KİŞİLERDE GLUT1, HIF1 $\alpha$ VE TBX21 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Larenks kanserlerinde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörler de suçlanmaktadır. Bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki ya da daha çok alternatif fenotipin görülmesi “genetik polimorfizm” olarak adlandırılmaktadır. Bu polimorfik yapının kanser gelişiminde etkin olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda bu bağlantıyı ortaya koymak için çok farklı moleküller ve polimorfizmler ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Biz bu çalışmada larenks kanseri tanılı hastalarda ve sağlıklı kontrol grubunda, daha önce bir takım hastalıklarla ve malignitelerle ilişkisi gösterilmiş olan, GLUT1 *rs710218*, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* ve TBX21 *rs17250932* tek nükleotid polimorfizmlerinin sıklığı ile larenks kanseri gelişimi ve tümör büyüklüğü, histolojik grade, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamıza, en az 30 yaşında ve en az 20 yıldır sigara içen, ek hastalığı bulunmayan 35 larenks kanser tanılı hasta ve 35 sağlıklı gönüllüyü dâhil ettik. Klinik takipte alınan kan örneklerinden DNA izolasyon kiti ile DNA elde edildi. Bu aşamadan sonra Real Time PCR yöntemi kullanılarak her iki grup için polimorfizmler saptandı ve allel grupları analiz edildi. Bulgular Student T ve Ki Kare testleriyle istatistiksel olarak değerlendirildi,  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

İki grup arasında değerlendirilen her üç polimorfizm için de genotip frekansı ve allel frekansı açısından anlamlı fark saptanmadı.

Hasta grubunda polimorfizmlerin ayrı ayrı tümör boyutu ve kanser evresi ile ilişkisi irdelendi. Üç polimorfizmde de bu parametrelerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Polimorfizmlerin lenf nodu metastazıyla da bağlantısının olmadığını saptadık. Hastaların hiç birisinde uzak metastaz gelişimi gözlenmediğinden, bu parametreyi çalışmamıza dâhil etmedik.



Yukarıda bahsedilen bulgular göz önüne alınarak larenks kanserinde GLUT1 *rs710218*, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* ve TBX21 *rs17250932* polimorfizmlerinin etkili olmadığı kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** larenks kanseri, GLUT1, HIF1 $\alpha$ , TBX21, gen polimorfizmi



## SUMMARY

### INVESTIGATING POLYMORPHISMS OF GLUT1, HIF1 $\alpha$ , TBX21 GENES IN SMOKERS WITH AND WITHOUT LARYNGEAL CANCER

Besides environmental factors, genetic factors are implicated in the development of laryngeal cancers. In a population, the appearance of two or more alternative phenotypes due to genetically determined diverse alleles is called as “genetic polymorphism”. It is considered that this polymorphic structure is of significant role in the development of cancer. In recent years many researches have been conducted to exhibit the association with various molecules and polymorphism.

We aimed to demonstrate the association of the frequency of single nucleotide polymorphisms GLUT1 *rs710218*, HIF1 $\alpha$  *rs11549465*, TBX21 *rs17250932* -of which the relationship was proved with various benign and malignant disease- with the development of larynx cancer, size, grade, lymph node metastasis and distant metastasis. We include in the study 35 patients with larynx cancer and 35 healthy volunteers at least 30 years old who smoke at least for 20 years. DNA is obtained from the blood samples by using isolation kit. Then polymorphisms for both groups were determined via Real Time PCR. The results were evaluated statistically by using Student T test and Chi Square,  $p < 0.05$  is accepted as significant.

No significant difference was detected regarding the genotype frequency and allele frequency within 3 polymorphisms assessed between two groups.

In the patient group, it is examined the association of polymorphisms with tumor size and grade one by one. No statistically significant relation was observed in 3 polymorphisms regarding the related parameters. Either we determined there was no relation between the polymorphism and lymph node metastasis. Since we observed no distant metastasis we did not include mentioned parameter in our study.

Considering the mentioned results above, GLUT1 *rs710218*, HIF1 $\alpha$  *rs11549465* ve TBX21 *rs17250932* polymorphisms have no impact on the development of laryngeal cancer.

**Key words:** laryngeal cancer, GLUT1, HIF1 $\alpha$ , TBX21, gene polymorphism

## KAYNAKLAR

1. Kirchner JA. Pressman and Kelemen's Physiology of the Larynx. 3rd ed. Washington: AAO-HNS Foundation Inc. 1986;10-5.
2. Crelin ES. Development of the Upper Respiratory System. Clinical Symposia (Ciba). 1976;28(3):20-4.
3. Ömür M, Gökçeer T. Larenks Kanserinin Yayılma Özellikleri. In: Ömür M, Önder D, Kaleli Ç, editörler. Larenks Kanseri ve Boyun. İstanbul: Haseki Hastanesi Vakfı Yayını. 1992;52-7.
4. Williams and Warwick. Gray's Anatomy 36th British Edition W.B.Saunders Company Philadelphia Churchill Livingstone. 1980.
5. Brockmuehl F. Die Behandlung und Prognose des Kehlkopfkrebess in der DDR von 1956-1966 und Epidemiologisch Gesichtspunkten. Berlin, Habel. 1977.
6. Wynder EL, Stellman SD. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. Cancer Research. 1977;37(12):4608-22.
7. Godin DA, Fitzpatrick PC, Scandurro AB, Belafsky PC, Woodworth BA, Amedee RG, et al. PH2O: A Novel Tumor Marker for Laryngeal Cancer. Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery. 2000;126:402-4.
8. Dokiya F, Ueno K, Ma S, Eizuru Y, Furuta S, Ohyama M, et al. Retinoblastoma Protein Expression and Prognosis in Laryngeal Cancer. Acta Otolaryngology. 1998;118:759-62.
9. Pietrantonio L, Felisati D, Finzi A. Laryngocele and laryngeal cancer. Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology. 1959;68(1):100-7.
10. Schantz SP. Carcinogenesis, Markers, Staging, and Prognosis of Head and Neck Cancer. Current Opinion in Oncology. 1993;5:483-90.
11. Chomchai JS, Du W, Sarkar FH, Jacobs JR, Ensley JF, Sakr W, et al. Prognostic Significance of p53 Gene Mutations in Laryngeal Cancer. Laryngoscope. 1999;109:455-9.
12. Marioni G, Marchese-Ragona R, Cartei G, Marchese F, Staffieri A. Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. Cancer Treat Rev. 2006;32(7):504-15.
13. Sadler TW. Head and Neck. In: Coryell P, editor. Langman's Medical Embiology. Baltimore (MD): Lippincott Williams and Wilkins. 1995;312-46.
14. Weisman RA, Moe KS, Orloff LA. Neoplasms of the Larynx and Laryngopharynx. In: Snow JBJ, editor. Ballengers's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery. Hamilton: BC Decker Inc. 2003;1255-98.
15. Ömür M. Boyun Topografik Anatomisi ve Boyun Lenfatikleri. In: Ömür M, Doğan Ö, Kaleli Ç, editörler. Larenks Kanseri ve Boyun. İstanbul: Haseki Hastanesi Vakfı Yayını. 1992;9-13.
16. Hajjawi OS. Glucose transport in human red blood cells. American Journal of Biomedical and Life Sciences. 2013;1(3):44-52.

17. Yorulmaz H. Hiperglisemi ve beyin. *Marmara Medical Journal*. 2013;26:118-21.
18. Kayaaltı Z, Özdemir F, Kaya-Akyüzlü D, Söylemezoğlu T, et al. Genotype and Allele Frequencies of -2841A>T Polymorphism in Glucose Transporter 1 gene in Turkish Population. *Marmara Pharmaceutical Journal* 2016;20:152-6.
19. Amann T, Kirovski G, Bosserhoff A, Hellerbrand C. Analysis of a promoter polymorphism of the GLUT1 gene in patients with hepatocellular carcinoma. *Molecular Membrane Biology*. 2011;28(3):182-6.
20. Kaygusuz G, Cansız C, Yıldız Y, Sağlık Y, et al. Sinovyal Sarkomlarda GLUT1 Ekspresyonu. *Türk Patoloji Dergisi*. 2009;25(3):100-5.
21. Demirel SH, Çetinkaya S. Hipoksiyle İndüklenen Faktör-1: Hücrenin Hipoksiye Fizyolojik ve Patolojik Cevabı. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2014;4(4):171-7.
22. Nagy G, Kovacs-Nagy R, Kereszturi E, Somogyi A, Szekely A, Nemeth N, et al. Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. *BMC Medical Genetics*. 2009;10:79.
23. Mera-Menéndez F, Hinojar-Gutiérrez A, Guijarro Rojas M, García de Gregorio J, Mera-Meneéndez E, J. Sánchez J, et al. Polymorphisms in HIF-1alpha affect presence of lymph node metastasis and can influence tumor size in squamous-cell carcinoma of the glottic larynx. *Clinical and Translational Oncology*. 2013;15:358-63.
24. Xu J, Xu L, Li LT, You Q, Cha LS. HIF1A gene Pro582Ser polymorphism and susceptibility to digestive tract cancers: a meta-analysis of case-control studies. *Genetics and Molecular Research* 2014;13(3):5732-44.
25. Li H, Zhen H, Han L, Yan B, Yu J, Zhu S, et al. Association between the genetic variations within TBX21 gene promoter and the clinicopathological characteristics of esophageal squamous cell carcinoma in a high-risk Chinese population. *Tumor Biology*. 2015;36:3985-93.
26. Başkan EB. T hücre immunitesi. *Türkderm*. 2013;47(1):18-23.
27. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genetic Variation in Individuals and Populations: Mutation and Polymorphism. *Thompson & Thompson Genetics In Medicine Seventh Edition*. 2007;9:183-6.
28. Ekmekçi A, Konaç E, Önen Hİ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık. *Marmara Medical Journal*. 2008;21(3):282-95.
29. Starska K, Forma E, Józwiak P, Bryś M, Lewy-Trenda I, Brzezińska-Błaszczak E, et al. Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer - The relationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression, tumor invasiveness, and patient prognosis. *Tumor Biology*. 2015;36:2309-21.
30. Aynali G, Dogan M, Sütçü R, Yüksel Ö, Yarıktaş M, Ünal F, et al. Polymorphic variants of MnSOD Val16Ala, CAT-262 C < T and GPx1 Pro198Leu genotypes and the risk of laryngeal cancer in a smoking population. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2013;127:997-1000.
31. Konac E, Dogan I, Onen HI, Yurdakul AS, Ozturk C, Varol A, et al. Genetic variations in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene and lung cancer. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*. 2009;234(9):1109-16.

32. Zhang L, Li Q, Li P, Zhu S, Wang J, Yang H, et al. Association between gastric cancer and -1993 polymorphism of TBX21 gene. *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(10):1117–22.
33. Liu Y, Sui J, Zhai L, Yang S, Huang L, Huang L, et al. Genetic polymorphisms in hypoxia-inducible factor-1a gene and its association with HBV-related hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Medical Oncology*. 2014;31(10):200.
34. Knechtel G, Szkandera J, Stotz M, Hofmann G, Langsenlehner U, Krippel P, et al. Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 gene and colorectal cancer risk. *Molecular Carcinogenesis*. 2010;49(9):805-9.
35. Xu J, Xu L, Li L, You Q, Cha L. HIF-1 $\alpha$  C1772T polymorphism and gastrointestinal tract cancer risk: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. 2013;17(12):918-25.
36. Ruiz-Tovar J, Fernandez-Contreras ME, Martín-Perez E, Gamallo C. Association of thymidylate synthase and hypoxia inducible factor-1alpha DNA polymorphisms with pancreatic cancer. *Tumori*. 2012;98(3):364-9.
37. Grabellus F, Sheu S, Bachmann H, Lehmann N, Otterbach F, Heusner T, et al. The XbaI G.T Polymorphism of the Glucose Transporter 1 Gene Modulates 18F-FDG Uptake and Tumor Aggressiveness in Breast Cancer. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2010;51(8):1191-7.
38. Bravatà V, Stefano A, Cammarata F, Minafra L, Russo G, Nicolosi S, et al. Genotyping analysis and 18FDG uptake in breast cancer patients: a preliminary research. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2013;32:23.
39. Fu SL, Miao J, Ding B, Wang XL, Cheng WJ, Dai HH, et al. A polymorphism in the 3' untranslated region of Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha confers an increased risk of cervical cancer in a Chinese population. *Neoplasma*. 2014;61(1):63-9.
40. Li P, Cao Q, Shao P, Cai H, Zhou H, Chen J, et al. Genetic polymorphisms in HIF1A are associated with prostate cancer risk in a Chinese population. *Asian Journal of Andrology*. 2012;14:864–9.
41. Fraga A, Ribeiro R, Príncipe P, Lobato C, Pina F, Maurício J, et al. The HIF1A functional genetic polymorphism at locus +1772 associates with progression to metastatic prostate cancer and refractoriness to hormonal castration. *European Journal of Cancer*. 2014;50(2):359-65.
42. Fraga A, Ribeiro R, Coelho A, Vizcaíno J, Coutinho H, Lopes J, et al. Genetic polymorphisms in key hypoxiaregulated downstream molecules and phenotypic correlation in prostate cancer. *BMC Urology*. 2017;17:12.
43. Qin C, Cao Q, Ju X, Wang M, Meng X, Zhu J, et al. The polymorphisms in the VHL and HIF1A genes are associated with the prognosis but not the development of renal cell carcinoma. *Annals of Oncology* 2012;23:981–9.
44. Lessi F, Mazzanti CM, Tomei S, Di Cristofano C, Minervini A, Menicagli M, et al. VHL and HIF-1 $\alpha$ : gene variations and prognosis in early-stage clear cell renal cell carcinoma. *Medical Oncology*. 2014;31(3):840
45. Yanagisawa Y, Munkhtulga L, Nakayama K, Iwamoto S, Charupoonphol P, Supannnatas S, et al. Diversity in genes responsible for lifestyle-related diseases in Asia-Pacific region. *Asia Pacific Journal of Public Health*. 2008;20:257-61.
46. Pontiroli AE, Capra F, Veglia F, Ferrari M, Xiang KS, Bell GI, et al. Genetic contribution of polymorphism of the GLUT1 and GLUT4 genes to the susceptibility

to type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in different populations. *Acta Diabetologica*. 1996;33(3):193-7.

47. Rufino M, Hernández D, Barrios Y, Salido E. The GLUT-1 XbaI gene polymorphism is associated with vascular calcifications in nondiabetic uremic patients. *Nephron Clinical Practice*. 2008;108(3):182-7.

48. López-Reyes A, Rodríguez-Pérez JM, Fernández-Torres J, Martínez-Rodríguez N, Pérez-Hernández N, Fuentes-Gómez AJ, et al. The HIF1A rs2057482 polymorphism is associated with risk of developing premature coronary artery disease and with some metabolic and cardiovascular risk factors. The Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Mexican Study. *Experimental and Molecular Pathology*. 2014;96(3):405-10.

49. Pichu S, Sathiyamoorthy J, Krishnamoorthy E, Umapathy D, Viswanathan V. Impact of the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) pro582ser polymorphism and its gene expression on diabetic foot ulcers. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2015;109(3):533-40.

50. Strauss E, Waliszewski K, Oszkinis G, Staniszewski R. Gene-environment interaction for the HIF1-A 1772C>T polymorphisms and cigarette smoking increase susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Przeegląd Lekarski*. 2012;69(10):744-9.

51. Bahadori B, Uitz E, Mayer A, Harauer J, Dam K, Truschnig-Wilders M. Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. *Vascular Medicine*. 2010;15(5):371-4.

52. Hlatky MA, Quertermous T, Boothroyd DB, Priest JR, Glassford AJ, Myers RM, et al. *American Heart Journal*. 2007;154(6):1035-42.

53. Andraweera PH, Dekker GA, Thompson SD, Dissanayake VH, Jayasekara RW, Roberts CT. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene polymorphisms in early and late onset preeclampsia in Sinhalese women. *Placenta*. 2014;35(7):491-5.

54. Zheng ZL, Hwang YH, Kim SK, Kim S, Son MJ, Ro H, et al. Genetic polymorphisms of hypoxia-inducible factor-1 alpha and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Nephron Clinical Practice*. 2009;113:104-11.

55. Wipff J, Dieude P, Avouac J, Tiev K, Hachulla E, Granel B, et al. Association of hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A) gene polymorphisms with systemic sclerosis in a French European Caucasian population. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2009;38(4):291-4.

56. Fernández-Torres J, Hernández-Díaz C, Espinosa-Morales R, Camacho-Galindo J, Galindo-Sevilla NC, López-Macay Á, et al. Polymorphic variation of hypoxia inducible factor-1 A (HIF1A) gene might contribute to the development of knee osteoarthritis: a pilot study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2015;16:218.

57. Zhu DY, Jiang LF, Deng XZ, Xiao W, Pei JP, Li BJ. TBX21 polymorphisms are associated with virus persistence in hepatitis C virus infection patients from a high-risk Chinese population. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015;34(7):1309-18.

58. Morita M, Watanabe M, Inoue N, Inaoka C, Akamizu T, Tatsumi KI. Functional polymorphisms in TBX21 and HLX are associated with development and prognosis of Graves' disease. *Autoimmunity*. 2012;45(2):129-36.

59. You Y, Zhao W, Chen S, Tan W, Dan Y, Hao F. Association of TBX21 gene haplotypes in a Chinese population with systemic lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 2010;39(3):254-8.