T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi:
Dr. Öğr. Üyesi Metin BUDAK

LARİNKS KANSERLERİNE *SMAD4* METİLASYONU YÖNÜNDEN EPİGENETİK BİR YAKLAŞIM

(Yüksek Lisans Tezi)

SELAHATTİN ALP TEMİZ

EDİRNE – 2020

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi:
Dr. Öğr. Üyesi Metin BUDAK

LARİNKS KANSERLERİNE *SMAD4* METİLASYONU YÖNÜNDEN EPİGENETİK BİR YAKLAŞIM

(Yüksek Lisans Tezi)

SELAHATTİN ALP TEMİZ

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2019/86

Tez No:

EDİRNE – 2020

TEŞEKKÜR

Tez dönemim süresince çalışmama destek olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Metin Budak'a, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ve Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tammam Sipahi'ye, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tevfik Gülyaşar'a ve tüm kıymetli Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma için gerekli materyali sağlayan Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı çalışanı Dr. Öğr. Üyesi Selis Gülseven Güven'e teşekkür ederim. Tez projeme ekonomik destek sağlayan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim. Çalışmam esnasında mesai kavramı tanımaksızın her vakit bana destek olan, eleştirel düşüncesi ve sorgulayıcı yaklaşımıyla kritik noktaları tekrar gözden geçirmeme yardımcı olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Mustafa Yıldız'a özel teşekkürü bir borç bilirim. Yaşamım boyu sağladıkları sosyal, kültürel ve ekonomik tüm katkıları için anama ve babama sonsuz sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**

GENEL BİLGİLER **3**

LARİNKS ANATOMİSİ **3**

LARİNKS'İN GELİŞİMİ **5**

LARİNKS FİZYOLOJİSİ **6**

LARİNKS KANSERLERİNDE EPİDEMİYOLOJİ **6**

LARİNKS KANSERLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK TEMELLERİ **12**

GEREÇ VE YÖNTEMLER **17**

BULGULAR **34**

TARTIŞMA **47**

SONUÇLAR **50**

ÖZET **52**

SUMMARY **54**

KAYNAKLAR **56**

TABLOLAR LİSTESİ **62**

ŞEKİLLER LİSTESİ **63**

ÖZGEÇMİŞ 65

EKLER 66

SİMGE VE KISALTMALAR

bç: Baz çifti

CpG: 5'-C-phosphate-G-3'

ddH_2O: Çifte distile su

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DNMT: DNA methyltransferase

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

g: Yerçekimi ivmesi

HPV: Human Papillomavirus

OR: Odds Ratio

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

SCC: Squamous Cell Carcinoma

SCCHN: Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck

***SMAD*:** Caenorhabditis elegans SMA ("small" worm phenotype) and Drosophila MAD ("Mothers Against Decapentaplegic") family of genes.

SMAD4: *SMAD* family member 4 proteine

***SMAD4*:** *SMAD* family member 4 gene

TAE: Tris bazı, Asetik Asit, EDTA içeren tampon çözelti

TGF-β: Transforming Growth Factor beta

’: Dakika

”: Saniye

GİRİŞ VE AMAÇ

Larinks kanserleri, tüm kanserlerin yalnızca %2'sini oluştururlar. Genellikle yaşamın dördüncü dekadından sonra ortaya çıkarlar ve kadınlara nazaran erkeklerde yaklaşık 7 kat daha sık görülür. Çevresel etkenler larinks kanserlerinin önemli tetikleyicileridir. Neredeyse tüm vakalarda tütün kullanımı söz konusuyken alkol ve asbestoz maruziyeti de risk faktörlerindendir. Larinks kanserlerinin %95'i tipik skuamöz hücreli karsinomalardır (SCC). Muhtemelen muköz glandlardan köken alan adenokarsinomalar da nadir larinks kanserleri arasında yer alırlar (1)

SMAD4, çoğu pankreatik adenokarsinomalarda ve kolon kanseri alt tiplerinde silinmiş ya da mutasyona uğramış halde bulunan, 18q kromozomu üzerinde yer alan bir tümör baskılayıcı gendir (2).

Canlıda tüm makromoleküler yapılar, genomda bulunan nükleotid dizileri tarafından belirlenir. Fakat gen ifadesini belirleyen, hücreden hücreye kalıtımla aktarılabilen, epigenetik kod olarak adlandırılan farklı bir mekanizma daha mevcuttur (3). Bu kodun oluşturulması esnasında DNA dizisi herhangi bir şekilde değişime uğramaz. Epigenetik mekanizmalar arasında üzerinde en çok çalışılmış ve en iyi anlaşılmış olanı DNA metillenmesidir (3, 4).

DNA metilasyonu 5'-C-phosphate-G-3' (CpG) adacıkları olarak ifade edilen özel bölgelerde görülür. CpG adacıkları 5' → 3' doğrultusunda Cytosine nükleotidini takip eden Guanine nükleotidinin oluşturduğu bir kümedir. CpG metillenmesi erken embriyonik dönemde programlanmakta, daha sonraki dönemlerde de korunmaktadır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde etkili olduğu için normal hücre işlevlerinin yerine getirilmesinde CpG

metillenmesinin önemi oldukça büyüktür. Örneğin, etkin olmayan X kromozomu üzerinde bulunan genlerin sessizleştirilmesi, yaşla ilgili veya dokuya özel genlerin ifadesinin düzenlenmesinde DNA metillenmesi önemli rol oynamaktadır (5).

Yukarıdaki bilgiler ışığında, *SMAD4* geninin metilasyonu ile *SMAD4* gen ifadesi engellenebilmekte ya da farklı oranlarda azaltılabilmektedir. Bu türden tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin azaltılması, kanserleşen hücrenin normal yaşam döngüsünde apoptozise gitmesi gerekirken yaşamını sürdürmesine, dolayısıyla kanserleşmesine yol açmaktadır.

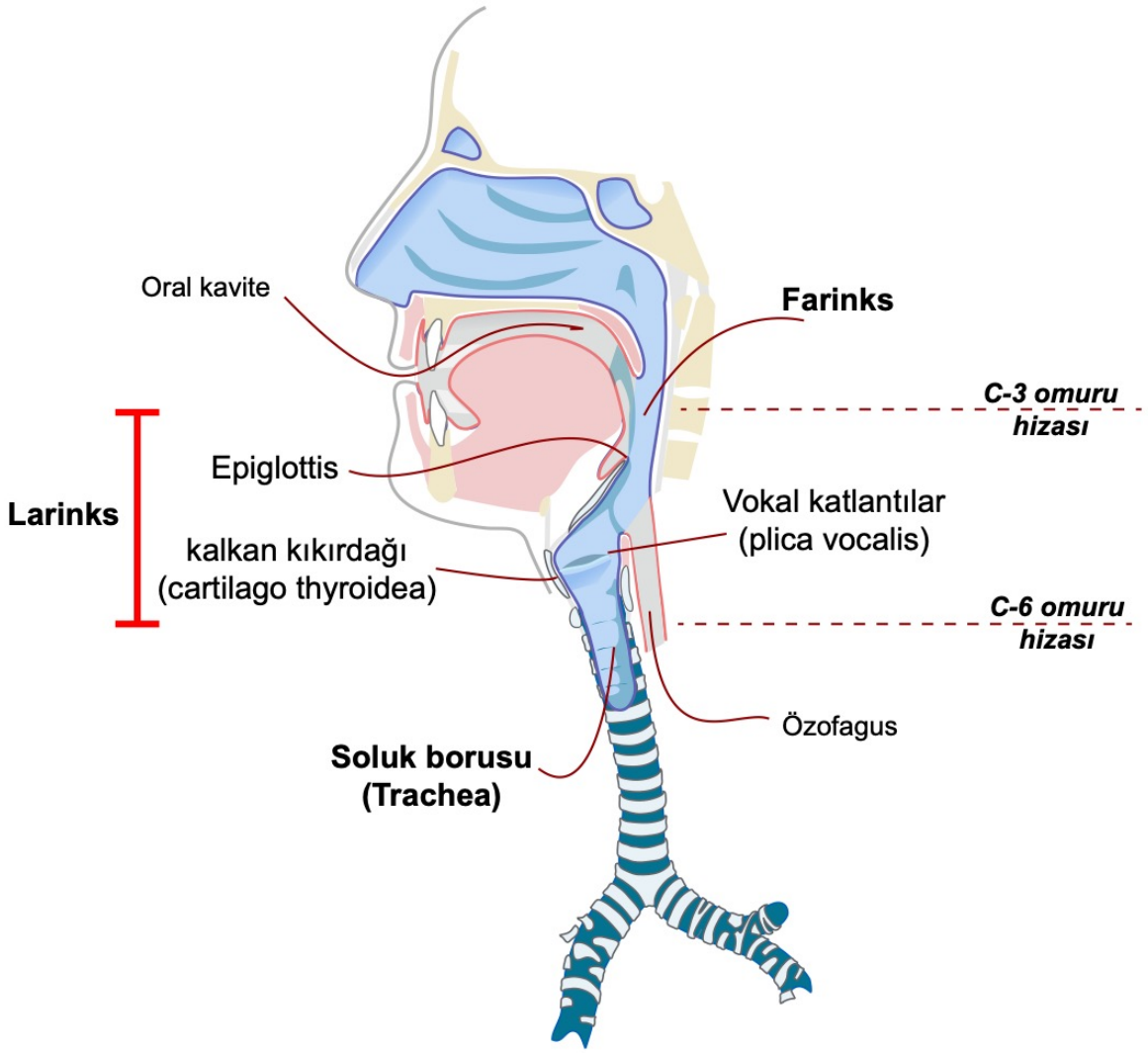
Literatürde kanserleşen çeşitli dokular üzerinde *SMAD4* metilasyonu yönünden yapılmış çalışmalar mevcuttur. Her ne kadar doğrudan larinks kanserlerinde *SMAD4* metilasyonu varlığı ve oranı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamışsa da bilhassa özofajiyel kanserlerde %70'e varan oranlarda *SMAD4* metilasyonu saptanması, larinks kanserlerinde de bu gen bölgesi ifadesinin etkili olabileceği fikrini oluşturmuştur.

Bu çalışma ile amaçlanan, *SMAD4* tümör baskılayıcı geninin üzerinde gerçekleşen metilasyonların larinks kanserli dokularda ne oranda bulunduğunu tespit etmektir. Elde edilecek sonuçlarla larinks kanserlerinin fizyopatolojisinin anlaşılmasına katkı sağlanması, tanı ve tedavide yeni yaklaşımlara olanak sağlanması hedeflenmektedir.

GENEL BİLGİLER

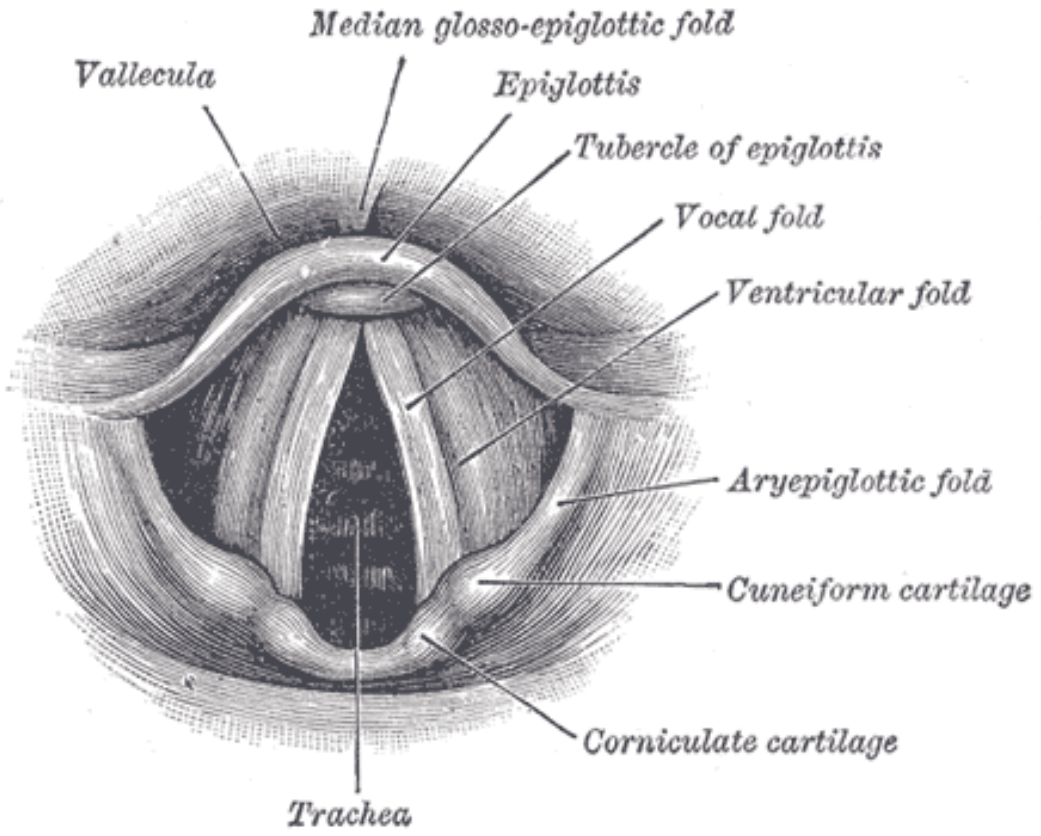
LARİNKS ANATOMİSİ

Larinks, 3. ve 6. servikal omurlar hizasında, boynun ön bölümünde yer alan bir organdır (Şekil 1). Üstte laringofarinks, altta ise soluk borusu ile komşuluğu bulunan larinks, bu iki yapıyı birbirine bağlar. Solunumda kullanılan havanın geçtiği bir patika olmasının yanı sıra, *epiglottis* vasıtasıyla alt solunum organlarına giden yolu koruyucu bir sfinkter görevini de üstlenir. Bu sfinkter ise yalnızca havanın geçiş hızını kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda havanın geçişi esnasında titreşerek çeşitli frekanslarda ses dalgaları da üreterek sözlü iletişime önemli katkı sağlar. Öyle ki larinks ile ilişkili pek çok hastalıkta, sözlü iletişim önemli ölçüde sekteye uğrar.



Şekil 1. Larinks anatomisi

Larinks gerek konumu gerekse biçimiyle kadın ve erkeklerde farklılık gösterir. Çocuklarda ve erişkin kadınlarda larinks, daha küçük kıkırdaklara sahiptir ve daha yüksek bir konumda yer alır. Erkeklerde 13-16 yaşlar arasında oldukça hızlı bir değişim görülür. Cinsiyet hormonlarının etkisiyle erkeklerde larinks aşağı doğru inerken tüm larinks kıkırdakları genişler. Bilhassa *cartilago thyroidea* (kalkan kıkırdağı), boyunda orta hatta öne doğru belirgin bir çıkıntı yaparak, eponim adı ile "Adem elması" olarak bilinen yapıyı oluşturur. Sagittal eksendeki bu genişleme, titreşerek sesin oluşumuna katkı sağlayan katlantılar olan *plica vocalis*'lerin boylarının uzamasına, böylelikle daha düşük frekansta titreşimler üretilmesine yani erkeklerde daha kalın sese neden olur. (Şekil 2) Her iki *plica vocalis*'in uzunluğu kadınlarda ortalama 16 mm, erkeklerde ise ortalama 24 mm uzunluğundadır (6).



Şekil 2. Larinks boşluğunda yer alan ses telleri (7)

LARİNKS'İN GELİŞİMİ

Larinks'in epiteliyal döşemesi, laringotrakeal tüpün kraniyal ucunun endoderminden gelişir. Larinks'in kıkırdakları dördüncü ve altıncı faringeal arkus çiftlerinin kıkırdaklarından gelişirler. Bu kıkırdakların kaynağı olan mezenşim, nöral krest hücrelerinden köken alır. Laringotrakeal tüpün kraniyal ucunda yer alan mezenşimin embriyonal dönemde hızla çoğalması, laringeal lümenin geçici olarak tıkanmasına yol açar. Embriyonal dönemin 10. haftasında bu lümen yeniden açık hale gelirken laringeal ventriküllerin oluşumu gerçekleşir. Bu rekanalizasyonların yardımıyla *plica vocalis*'leri oluşturan müköz membran katlantıları meydana gelir.

Epiglottis, üçüncü ve dördüncü faringeal arkusların ventral tarafında yer alan mezenşimden farklılaşan hipobrakiyal kabartının kaudal tarafından oluşur.

Laringeal kaslar ise dördüncü ve altıncı faringeal arkus çiftlerinin miyoblastlarından gelişirler. Bu kaslar 10. kafa çifti olan *nervus vagus*'un laringeal dalları tarafından innerve edilirler (8).

LARİNKS FİZYOLOJİSİ

Solunum sisteminin sindirim sisteminden ayrıldığı bir kavşak olan larinks, kıkırdak ve kemiklerce desteklenen bir altyapıya sahip, elastik membranlar, ligamentler, eklemler, kaslar, sinirler, damarlar ve müköz membranlardan mamuldür. Bozulmamış fonksiyonu ile yutkunma esnasında havayolunu kapatarak havanın sindirim sistemine doğru yol almasını önler, havayolunu hava dışındaki maddelere karşı güvenlik altına alır ve sözlü iletişim için gerekli frekanslarda ses dalgaları üretiminin ana kaynağı olma rolünü üstlenir.(9)

Başlıca dört fazdan oluşan yutma eyleminin üçüncü fazında, takriben saniyenin üçte ikisi kadar bir zaman dilimi içinde hyoid ve larinksin süperior-anterior hareketi gerçekleşerek başarılı bir yutma sağlanır. Krikoid kartilajın halkasallığı soluk alıp vermenin sürdürülmesini sağlar. Larinksin filogenetik olarak en yeni fonksiyonu ise larinksin inişi sayesinde mümkün olabilmiş fonasyondur (9-11).

LARİNKS KANSERLERİNDE EPİDEMİYOLOJİ

Sınıflama

Larinks kanseri, topografik olarak baş boyun kanserleri başlığı altında, sistematik olarak solunumsal kanserler başlığı altında, histopatolojik köken olarak da karsinomlar başlığı altında sınıflandırılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflamasında C30 - C39 arası kodlanan respiratuvar sistem ve intratorasik organlar başlıkları altında incelenmektedir. Larinks kanserlerine bu sınıflamada ayrılan kod C32'dir. Kanserleşen dokunun ilk yerleşimine göre daha alt düzeyde sınıflamalar da mevcuttur. C32.0 glottis, C32.1 supraglottis, C32.2 subglottis, C32.3 laringeal kıkırdak, C32.8 larinksin örtüşen lezyonları, C32.9 ise tanımlanmamış larinks kanserlerini ifade etmede kullanılır (12).

Evreleme

Larinks kanserlerinin evrelendirilmesinde kullanılan en güncel kılavuz olarak AJCC (American Joint Committee on Cancer) tarafından 2018 yılında 8. baskısı yayınlanan "AJCC Cancer Staging Manual" kullanılmaktadır. Kılavuzda TNM olarak modellenen bir evreleme sistemi kullanılır. T ile ifade edilen primer tümörün derecesidir. Tümörün başlangıç noktasını

ve başladığı primer dokuda hangi katmanlara tutulum gösterdiğini ifade eder. Diğer topografyalardaki TNM evrelemesinden farklı olarak larinks kanserlerinde T derecelendirmesi, vokal kordların hareket kabiliyetleri hakkındaki değerlendirmeye göre de derece farkı gösterir. N ile belirtilen lenf nodlarının tutulumunu lenf nodu boyutu ve tutulan lenf nodu sayısına göre seviyelendirmek için kullanılır. M ise uzak organ metastazlarını belirtmek için kullanılan derecedir (13).

Larinks kanserlerinde evreleme, larinksin üç bölgeye ayrılması ile yapılmaktadır. Glottis adlı yapının üst tarafında lokalize olan kanserlerde supraglottik larinks kanseri evrelemesi (Tablo 1), glottis etrafında gelişen kanserler için glottik larinks kanseri evrelemesi (Tablo 2), glottis'in alt kısmında yer alan kanserler için ise subglottik larinks kanseri evrelemesi (Tablo 3) kullanılır.

Tablo 1. Supraglottik larinks kanseri evrelemesi

T Kategorisi		**T Kriteri**
TX		Primer tümör değerlendirilemez.
Tis		Karsinoma *in situ.*
T1		Normal vokal kord hareketleri görülmekle birlikte tümor supraglottisin bir alt katmanına sınırlıdır.
T2		Tümor; supraglottisin birden fazla alt katmanının mukozasını, glottisi ya da supraglottis dışındaki başka bir bölgeyi (dil kökü mukozası, vallecula, piriform sinusun medial duvarı, gibi) tutmuştur. Vokal kord henüz hareketlidir.
T3		Tümör larinks ile sınırlı ve vokal kord sabitleşmiş ve/veya şunlardan herhangi birinin tutulumu mevcuttur: postkrikoid alan, preepiglottik alan, paraglottik alan, ve/veya tiroid kıkırdağın iç korteksi.
T4		Orta ya da çok ilerlemiş.
	T4a	Orta ilerlemiş lokal hastalık. Tümör, tiroid kıkırdağın dış korteksini boylu boyunca ve/veya larinks ötesindeki organları (trake, dilin derin ekstrinsik kası dahil yumuşak dokular, şerit kaslar, tiroid ya da özefagus) tutmuş.
	T4b	Çok ileri lokal hastalık. Tümör, perevertebral alanı tutumuş, karotid arteri örtmüş ya da mediastinal yapıları tutmuş.

Tablo 2. Glottik larinks kanseri evrelemesi

T Kategorisi		T Kriteri
TX		Primer tümör değerlendirilemez.
Tis		Karsinoma *in situ.*
T1		Tümör vokal kord(lar)a sınırlı olmakla birlikte normal hareketlidir.
	1a	Tümör tek vokal korda sınırlı.
	1b	Tümör her iki vokal kordu tutmuş.
T2		Tümör supraglottis ve/veya subglottise yayılmış ve/veya azalmış vokal kord mobilitesi.
T3		Tümör larinkse sınırlı ve vokal kord sabitleşmesi ve/veya paraglottik aralık ve/veya tiroid kıkırdağının iç korteksinin tutulumu.
T4		Orta ya da çok ilerlemiş.
	4a	Orta ilerlemiş lokal hastalık. Tümör, tiroid kıkırdağın dış korteksini boylu boyunca ve/veya larinks ötesindeki organları tutmuş.
	4b	Çok ileri lokal hastalık. Tümör, perevertebral alanı tutumuş, karotid arteri örtmüş ya da mediastinal yapıları tutmuş.

Tablo 3. Subglottik larinks kanseri evrelemesi

T Kategorisi		T Kriteri
TX		Primer tümör değerlendirilemez.
Tis		Karsinoma *in situ.*
T1		Tümör subglottis ile sınırlı.
T2		Tümör vokal kord(lar)a yayılmış ve normal ya da bozulmuş mobilite.
T3		Tümör larinkse sınırlı olmakla birlikte vokal kord sabitleşmesi ve/veya paraglottik aralık ve/veya tiroid kıkırdağının iç korteksinin tutulumu.
T4		Orta ya da çok ilerlemiş
	4a	Orta ilerlemiş lokal hastalık. Tümör krikoid ya da tiroid kıkırdağı ve/veya larinks ötesindeki organları tutmuş.
	4b	Çok ileri lokal hastalık. Tümör, perevertebral alanı tutumuş, karotid arteri örtmüş ya da mediastinal yapıları tutmuş.

İnsidans

2018 yılı içerisinde tüm dünyada her iki cinsiyetten toplamda 177.422 yeni larinks kanseri tanısı almış olgu bildirilmiştir. Yine aynı yıl içerisinde tüm dünyada her iki cinsiyetten toplamda 94.771 larinks kanserli birey yaşamını yitirmiştir (14). Gerek insidans gerek mortalite yönünden bu sayılar, tüm bölgelerde görülen kanser vakaları arasında larinks kanserlerinin %1'lik bir orana tekabül ettiğini gösterir.

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın 2017 yılında yayımladığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı'na göre 2015 yılında erkeklerde larinks kanseri insidansı 100.000 kişide 6,6; kadınlarda ise 100.000 kişide 0,5 olarak bildirilmiştir (15). Türkiye'de 2010-2014 yılları arasında 5655 adet larinks kanseri bildirilmiştir. Bu vakaların %93,7'sinde histolojik doğrulama yapılmıştır. Yine 2010-2014 yılları arasında bu vakaların %1'i hakkında ancak ölüm nedeni ile bildirim yapılmıştır (16).

Mortalite ve Sağkalım

Birleşik Devletler Ulusal Kanser Enstitüsü'nün yayınladığı rapora göre 1950-2016 yılları arasında larinks kanserine bağlı mortalite, yılda ortalama %0,9 oranında azalma göstermiştir. 1950-1954 yılları arasındaki 5 yıllık sağkalım oranı %52 iken; 2009-2015 yılları arasındaki 5 yıllık sağkalım oranı %64,6'ya yükselmiştir (17).

Türkiye İstatistik Kurumu'nun 26 Nisan 2019 tarihinde yayımlanan 30626 sayılı Ölüm Nedeni İstatistikleri adlı bültenine göre 2018 yılında gerçekleşen ölümlerin %19,7'sini benign ve malign neoplazmlar oluşturmuştur. Bunlar arasında da en yüksek payın ise %30,8 ile larinks, trakea, bronş ve akciğerleri kapsayan solunum sistemine ait malign neoplazmlara ait olduğu raporlanmıştır (18).

Risk Faktörleri

Tütün:

Tütün ürünleri kullanımının larinks kanserleri için en güçlü çevresel faktör olduğu pek çok farklı çalışmada ortaya konmuştur (19). Tütün tüketimini derecelendirmek için sigara adedi birim olarak kullanılır. Bu bağlamda 1 puro 5 sigaraya, 1 pipo ise 2,5 sigaraya denk kabul edilir. Sigara veya diğer tütün ürünlerinin hiçbirini tüketmeyenler, larinks kanseri tanısı

alan erkek hastaların yalnızca %2'sini oluşturmaktadır. Bununla beraber farklı türlerde tütün ürünlerinin kullanımının glottik ya da supraglottik kanser vakalarında dağılımı için belirgin bir fark gözlenmemiştir. Önceden sigara kullanma öyküsü olup daha sonradan sigara kullanımını bırakanlarda riskin azaldığı belirtilmiştir. Filtresiz sigara kullananlarda filtreli sigara kullananlara görece riskin daha fazla olduğu gösterilmiştir (20). Sigara kullanım süresi arttıkça larinks kanseri görülme oranı artış göstermektedir. Intrinsik larinks kanserli hastaların %59,4'ü 40 yıl ya da daha fazla süre sigara kullanma öyküsüne sahipken 20 yıl ya da daha az süreyle sigara kullanan hastaların oranı yalnızca %3,8'dir. Günde tüketilen sigara adedi de risk faktörünü artırmaktadır. Intrinsik Larinks kanserli hastaların %9,4'ü günde 15 veya daha az sayıda sigara içerken %90,6'sının günde 16 veya daha fazla sigara tükettiği belirtilmiştir (21).

Alkol:

Larinks kanserli hastalarda yapılan çalışmalarda örneklem gruplarında alkol kullanımının, tütün kullanımı ile birlikteliği göze çarpmaktadır.

Alkol tüketimini derecelendirmek için kullanılan en yaygın birim "ünite"dir. 29,6 ml viski ya da 118,4 ml şarap ya da 236,8 ml bira tüketimi 1 ünite alkol tüketimine denktir.

Her ne kadar alkol kullanımı ile birlikte tütün kullanımının ayrılamaz etkisi göz önünde tutulsa da orta ve ağır dereceli alkol tüketiminin de tütünden bağımsız olarak bir risk faktörü olduğu rapor edilmiştir. Bilhassa supraglottik larinks kanserlerinde ağır derecede alkol kullanımı, subglottik ve glottik larinks kanserlerine göre daha yüksek risk faktörü olarak gösterilmiştir. Yine de aşırı alkol tüketimi bulunan hastalarda subglottik ve glottik larinks kanserlerinde de kayda değer rölatif risk tarif edilmiştir. Hafif derecede yani 207 ml'den az miktarda alkol tüketiminin bu iki bölge kanserleri üzerine etkisi daha azdır (19).

Tütün ve alkol birlikteliği:

Birbirinden bağımsız olarak tütün ve alkol kullanımı, dereceli olarak larinks kanseri görülme sıklığını artırmaktadır. Larinks kanserli hastaların etkene maruziyetlerinin hastalığa yakalanma oranlarına etkisinin incelendiği bir araştırmada bağımsız ve kombine göreli oranlar (OR) saptanmıştır. Buna göre tütün kullanan ancak alkol kullanmayanlardaki OR artışı, alkol kullanan ancak tütün kullanmayandara göre daha fazladır. Ancak alkol ve tütünün birlikte tüketiliyor olması OR üzerinde belirgin artışa neden olmaktadır. Baş ve boyun kanserlerinde

yüksek miktarda tütün ve alkol tüketimiyle görülen OR artışı erkeklerde 38 iken kadınlarda 100'ün üzerindedir (22).

Tütün kullanımının orofaringeal flora üzerine ciddi etkisi mevcuttur. Özellikle oral flora üzerindeki değişim tüm kavite içerisindeki metabolik aktiviteyi etkileyebilmektedir. Normalde karsinojenik etkisi bulunmayan etanolün, değişen oral florada yüksek ölçekte asetaldehite dönüşerek karsinojenik aktiviteye yol açması, sigara ile birlikte alkol tüketiminin baş-boyun kanserlerinin patogenezi üzerine açıklama getirmektedir (23).

Human papillomavirus:

Human papillomavirus (HPV), diğer skuamöz hücreli kanserlerde olduğu gibi larinksin skuamöz hücreli kanserleri ile de ilişklilendirilmektedir. Özellikle HPV tip 16 ve daha az olmak kaydıyla tip 18'in baş ve boynun skuamöz hücreli kanserlerinde (SCCHN) anlamlı derecede nedensel faktör olduğu belirlenmiştir (24, 25). SCCHN tanısı almış hastaların yaklaşık %25'inde HPV genomik DNA'sına rastlanmıştır (26).

Diğer risk faktörleri:

Tütün, alkol ve HPV'ye göre çok daha az da olsa SCCHN'ler ile çeşitli risk faktörleri arasında ilişkiler bulunmuştur. Diyet ile ilişkili risk faktörleri arasında yumurta, kırmızı et ve işlenmiş et ürünleri tespit edilmiştir. Süt, balık, çiğ sebze ve turunçgillerin tüketiminin ise koruyucu yönde etkili olduğu görülmüştür (27).

Zehirli gazlara maruziyetin de solunum yolu kanserlerinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Hardal gazı üretim tesisinde çalışan işçilerde toksinlere maruziyetin larinks kanseri riskini 5 kata kadar artırdığı bildirilmiştir (28).

Gastroözofagial reflü hastalarında laringofaringeal bölgeye yönelen gastrik materyalin SCCHN üzerine etkili olduğu yönünde raporlar mevcuttur (29, 30)

LARİNKS KANSERLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK TEMELLERİ

Bir organizmanın yaşamsal faaliyetleri esnasında kullandığı tüm makromoleküler yapılar, genomda bulunan nükleotid dizileri tarafından belirlenir. Nükleotid dizileri yalnızca 4 farklı molekülün çeşitli permütasyonlarla dizilişiyle ilk bakışta son derece yalın görünen bir yapıya sahiptir. Ancak söz konusu dizi üzerinde yer alan kod, her zaman dizili haliyle yönetsel işevlere katılmayabilir. Bazı gen bölgelerinin susturulması ile de ortaya çıkabilen, genler üzerindeki etkiler, grekçe ilgeç önekinin (epi-) eksiksiz olarak ifade ettiği gibi epigeneteik olarak adlandırılmaktadır (31).

Epigenetik Etkileşimler

Epigenetik etkileşimler, DNA diziliminde değişikliğe yol açmayan, kalıtsal olarak aktarılabilmesine rağmen gen ifadesinde geri dönüşü mümkün genetik düzenlemelerdir (32). Bu düzenlemeler, histon modifikasyonu ve DNA metilasyonu ile gerçekleşebilir. Epigenetik değişimlerin gen ifadesi üzerinde etkin bir rolü bulunur. Sonuçta embriyonik gelişimden karsinogeneze varana dek epigenetik modifikasyonların etkisi görülür.

DNA Metilasyonu

Epigenetik mekanizmalar arasında üzerinde en çok çalışılmış ve en iyi anlaşılmış olanı DNA metillenmesidir (3, 4). Enzimatik bir değişim olup sitozinlerin 5’-metil sitozine dönmesi ile oluşur. Memeli genomunda görülen sitozin uç metillenmesi genellikle CpG ikili nüleotidleri olarak da isimlendirilen 5’-CG-3’ ikili nukleotidlerinde gerçekleşir (33). Metillenme DNA metil transferazlar (DNMT) tarafından gerçekleştirilir. DNMT ailesinin DNMT1, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B olmak üzere dört üyesi bulunmaktadır. Bu enzimler kendi aralarında metillenmiş bölgeyi koruyan ve yeni metil grupları ekleyenler olmak üzere ikiye ayrılırlar. İnsan genomunun tüm CpG ikili nüleotidlerinin %70 kadarı metilenmiş durumdadır (34). Geriye kalanlar ise yaklaşık 200 baz çifti büyüklüğünde CpG’ce zengin promotör bölge veya genlerin ilk eksonlarında bulunan bölgelerdir. Bu bölgeler CpG adacıkları olarak da isimlendirilir ve tüm genlerin %60’ında bulunur (35).

Genomik imprinting (baskılanma) DNA metillenmesinin bir diğer örneğidir ve tek allellik gen ifadesinin gerçekleşmesinde rol alır. Bu şekilde yaklaşık 80 lokusun baskılandığı bulunmuştur. Bu genlerin dokuya ve duruma özel ifadelerinin gerçekleşmesi metillenmenin düzenlenmesi ile olmaktadır (36). 70’li yılların sonunda tümör hücrelerinin genomunda metil-

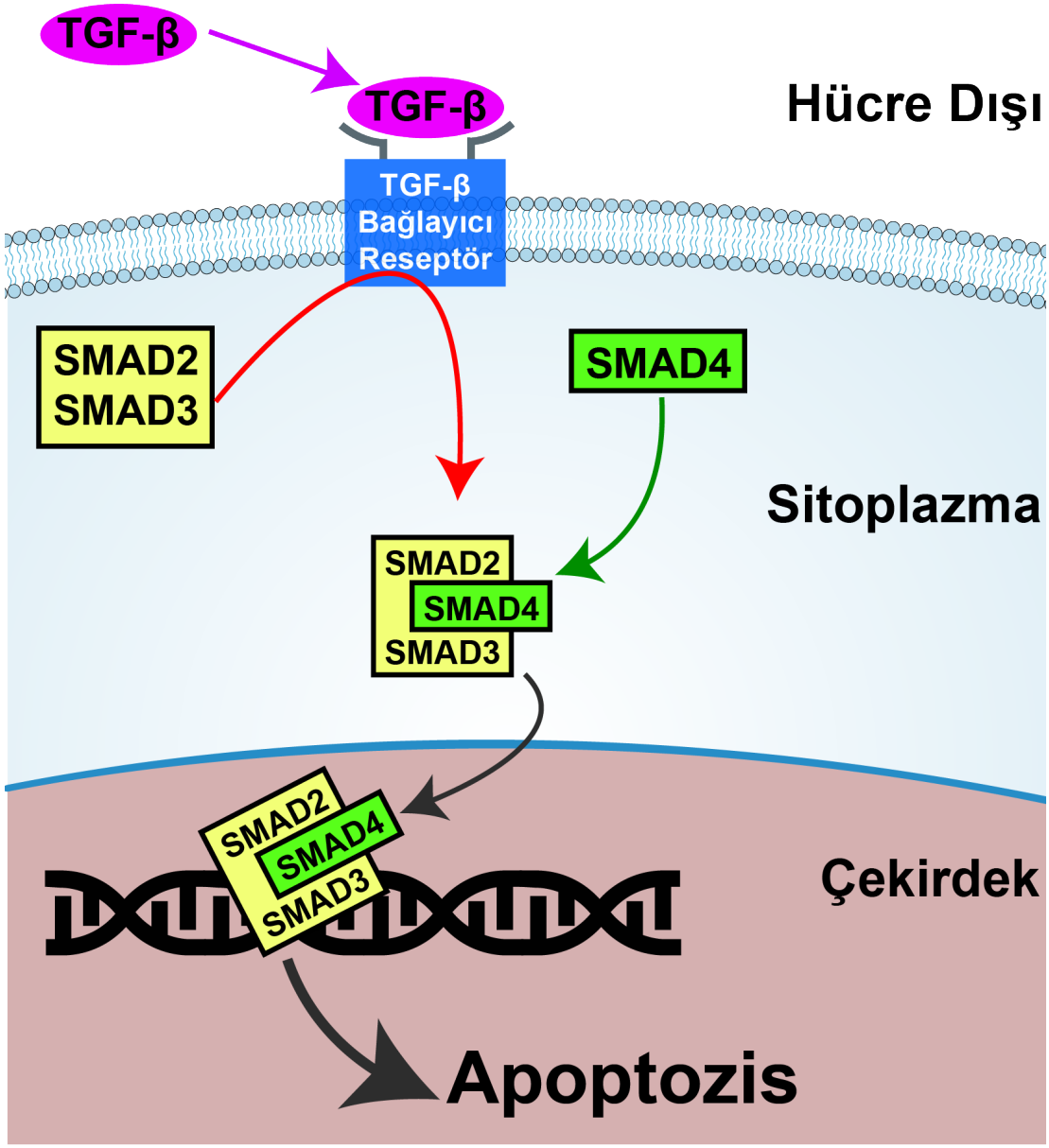
sitozin sayılarında azalma olduğu gözlenmiştir (37). Bu durum DNA'nın az metillenmesi olarak isimlendirilmiş, selim ve habis tümörlerin genomlarında gösterilmiştir (38).

SMAD4 Geni

SMAD4, çoğu pankreatik adenokarsinomalarda ve kolon kanseri alt tiplerinde silinmiş ya da mutasyona uğramış halde bulunan, 18q kromozomu üzerinde yer alan, bir tümör baskılayıcı gendir. Bu gen, TGF-β'nın büyüme baskılayıcı etkilerinin bir esansiyel intraselüler mediyatörü olan, SMAD4'ü kodlar. SMAD4 proteini, DNA bağlama ve diğer SMAD proteinleri ile oligomerizasyon için esansiyel olan, MH1 ve MH2 olmak üzere iki önemli domaine sahiptir. Mutant SMAD4, proliferasyonun TGF-β-bağımlı inhibisyonunu bloke eder. *SMAD4*'teki germline mutasyonlar Juvenil Polypozis Sendromu (JPS) ile sonuçlanır (2). *SMAD4* tümör baskılayıcı gen (kromozom 18q), pankreatik kanserlerin %55'inde inaktive haldedir. *SMAD4*, hücre yüzey reseptörlerinin TGF-β ailesinden sinyal iletiminde önemli rol oynayan bir protein kodlar (39).

SMAD4 Proteini

SMAD4, hücre yüzeyinden nükleusa doğru kimyasal sinyal taşıyan protein ürünü olan bir gendir. Bu sinyal yolağı TGF-β yolağı üzerinden çalışmaktadır ve hücrenin çevresel ortamından etkilenebilmektedir. Sinyal oluşumu TGF-β proteininin hücre yüzeyindeki ilgili reseptöre bağlanmasıyla başlar ve bu olay SMAD grubu proteinlerin aktifleşmesini sağlar. SMAD proteinler SMAD4'e bağlanarak bir protein kompleksi oluşturur ve kompleks hücre çekirdeğine doğru hareket eder. Çekirdekte de büyüme ve tümör baskılayıcı genlerin aktivasyonunu kontrol eder (40-42). Bu olaylar Şekil 3'te görselleştirilmiştir.



Şekil 3. TGF-β öncülüğünde SMAD4 aracılığıyla kanserleşen hücrenin intihara zorlanması

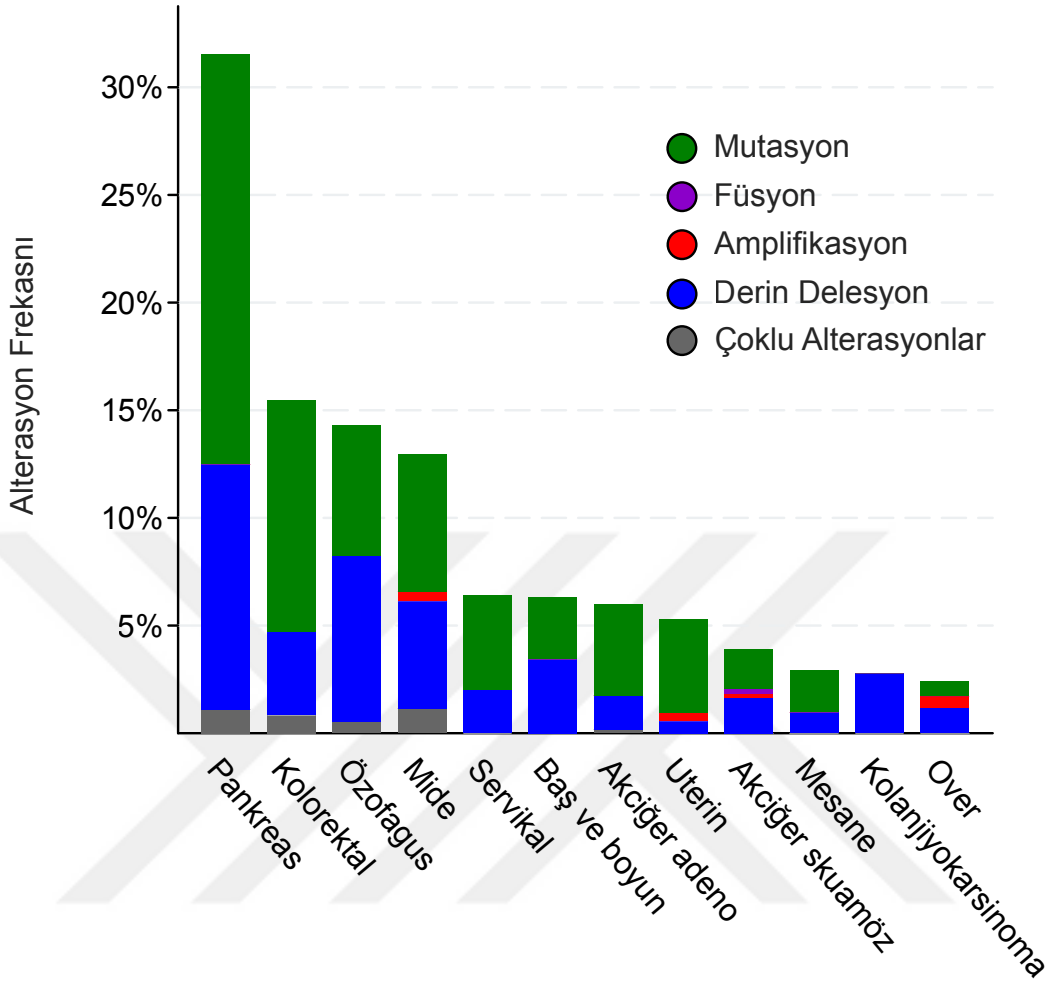
SMAD4 İlişkili Kanserler

Tüm canlı organizmalarda yaşamın devamlılığını sağlayan en önemli unsurlardan biri yönetici moleküllerin tetiklemesiyle oluşan hücre bölünmesidir. Hücre bölünmesi doku düzeyinde hücresel nicelik artışını sağlarken aynı zamanda yönetici moleküllerin de çoğaltılmasını kaçınılmaz kılar. Canlı yapılar, yaşamsal faaliyetleri esnasında, kendilerinin de bir bileşeni olduğu ekosistem ile doğrudan ve dolaylı pek çok etkileşim içinde bulunurlar. Söz konusu etkileşim hücreyi yöneten molekülün de çeşitli etkenlerce zaman içerisinde

değiştirilmesine yol açar. Yönetici molekül üzerinde gerçekleşen değişimlerin yaşamla bağdaşanları varlığını sürdürmeye devam ederek bölünme sonrası yeni hücrelere aktarılır. Yaşamla bağdaşmayanlar ise hücresel ortamı bozarak faaliyetlerin sürdürülmesini olanaksız kılarken yönetici molekülün de sonunu hazırlar.

Çevresel etkenlerin yönetici molekül üzerine değiştirici etkileri hücre bölünmesini kontrol eden bölgelerdeki bir zincire denk gelebilir. Yönetici molekülün çift zincirli olması sayesinde çoğu kez bu hasar kolaylıkla telafi edilebilir. Ancak çift vuruş hipotezi olarak adlandırılan, aynı bölgedeki iki mutasyon total bir kayba yol açarak tamiri oldukça güçleştirir (43). Bu durum kontrolsüz hücre bölünmesine, daha alışılageldik bir ifade ile kanserleşmeye yol açabilir.

SMAD4 halen çeşitli kanser türleri üzerinde etkinliğinin ne düzeyde olduğu incelenen bir tümör baskılayıcı gen bölgesidir. *SMAD4* üzerine çalışmalar epitel hücre kökenli kanserler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Anlamlı bulgu veren kanserler çoğunlukla gastrointestinal kanal ve pankreas ile ilişkilidir. Genomik kanser araştırmalarının dizinlendiği bir veritabanında güncel verilere göre çeşitli kanserlerin *SMAD4* genetik değişim frekansları Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. İnsan kanserlerinde saptanan SMAD4 genetik değişim frekansları (44-46)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

GEREÇLER

Etik Kurul

Larinks Kanserlerine *SMAD4* Metilasyonu Yönünden Epigenetik Bir Yaklaşım başlıklı tez çalışmasını başlatabilmek için gerekli etik kurul raporu için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'na TÜTF-BAEK 2019/87 protokol numarası ile başvuruldu.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25.02.2019 tarihli toplantısında alınan 04/20 numaralı karara göre çalışmamızın etik bilimsel standartlar açısından sakınca barındırmadığı yönünde mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir (Ek 1).

Güç Analizi ve Dahil Kriterleri

Gruplar arasında metilasyon görülme oranlarında %40'lık bir farkı %5 yanılma payı ve %95 güç ile test etmek için iki yönlü Anova testi yardımıyla yapılan örneklem analizi sonucunda 32 bireyden oluşan hasta ve sağlıklı örnek gruplarına gereksinim olduğu saptanmıştır (Ek 2).

Gönüllülerin araştırmaya dahil edilme kriterleri:

i. Larinks kanseri tanısı alması
ii. 18 yaşından büyük olması

iii. Kadın ve Erkek hastalar

Gönüllülerin araştırmaya dahil edilmeme kriterleri:

i. Çalışmadan ayrılmak istemesi
ii. Çalışmanın sonuçlarını karıştırıcı faktör olarak etkileyebilecek türden başkaca herhangi bir hastalığının bulunması.
iii. 18 yaşından küçük olması.

Örneklem Kümesi

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'na larinks kanseri şüphesi ile kabul edilmiş, biyopsi materyalleri ile patolojik olarak larinks kanseri tanıları teyit edilmiş 34 gönüllü hastadan tümör dokusu ve kontrol dokusu temin edildi. 3 gönüllü hasta, kontrol dokularından DNA elde edilemediğinden çalışma dışında bırakıldı. Bulgular kısmında bu 3 hasta örneklem kümesindeki kayıp veri olarak ifade edilerek hesaplama dışı bırakıldılar.

Tümör dokuları, tanı ve tedavi seyirlerinin takibinin yapıldığı rutin biyopsi incelemelerinden elde edilen biyopsi materyali kullanılarak, hastalara ayrıca bir girişim uygulanmadan elde edildi.

Kontrol dokusu olarak ise yanak içi mukoza tabakasından sağlıklı epitel hücrelerin sürüntüsü, buccal swab yardımı ile poliklinik koşullarında elde edildi.

Kendilerine gerekli açıklamalar yapıldıktan sonra çalışmada yer almaya gönüllü olan bireylerin onamları "Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu" aracılığı ile kayıt altına alınmıştır (Ek 3).

Çalışmada Kullanılan Aygıtlar

Yatay jel elektroforez sistemi: MultiSUB midi, Cleaver scientific, Birleşik Krallık

Elektroforez doğru akım kaynağı: EC 105, E-C Apparatus, Fransa

Buzdolabı (+4): ENXTY, Hotpoint Ariston, İtalya

Derin dondurucular (-18):

1. ENXTY, Hotpoint Ariston, İtalya
2. TAAN, Indesit, İtalya

Su distilasyon cihazı: 2004, Gesellschaft für Labortechnik, Almanya

Otoklav cihazı: OT 012, Nüve, Türkiye

Etüv cihazı: Function Line, Heraeus, Almanya

Mikro pipetler:

1. Finnpipette, Thermo Scientific, Finlandiya
2. Ecopipette, CAPP, Danimarka
3. Micropipette, ISOLAB, Almanya

PCR cihazları:

1. Exicycler 96, Bioneer, Güney Kore
2. Techgene, Techne, Birleşik Krallık

Kesintisiz güç kaynağı: 11, Lega, Türkiye

Mikrodalga fırın: MS23K3515AW, Samsung, Güney Kore

Santrifüj cihazı, Centric 350, Tehtnica, Slovenya

Terazi: Entris, Sartorius, Almanya

Thermal karıştırıcılar:

1. TS-100C, Boeco, Almanya
2. TS-100, Biosan, Litvanya

Orbital karıştırıcılar: PSU-10i, Biosan, Litvanya

Vorteks karıştırıcı: ZX3, VELP Scientifica, İtalya

Nanodrop spektrofotometre: Nano-100, Allsheng, Çin

UV lamba: ETX-20, Vilber Lourmat, Fransa

UV jel görüntüleyici: MiniBIS Pro, DNR Bio Imaging System, İsrail

Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

DNA izolasyon kiti: Purelink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, ABD

Bisülfit modifikasyon kiti: EpiJET Bisulfite Conversion, Thermo Scientific, ABD

Agaroz: Algae, Sigma-Aldrich, Almanya

DNA Ladder Marker: 100 bp, Invitrogen, Litvanya

PCR Master Mix: Maxima Hot Start, Thermo Scientific, ABD

Etanol: %99,9, Merck, Almanya

Etidyum Bromür: UltraPure, Fisher Scientific, ABD

Primer: *SMAD4* Metilasyon Spesifik, Sentebiolab, Türkiye

Proteinaz K: Tritirachium album, Sigma-Aldrich, Almanya

TAE buffer (Tris bazı, Asetik asit, EDTA): Merck, Almanya

TEB buffer (Tris bazı, EDTA, Borik asit): Merck, Almanya

DNA jel yükleme boyası: Blue Juice, Invitrogen, Litvanya

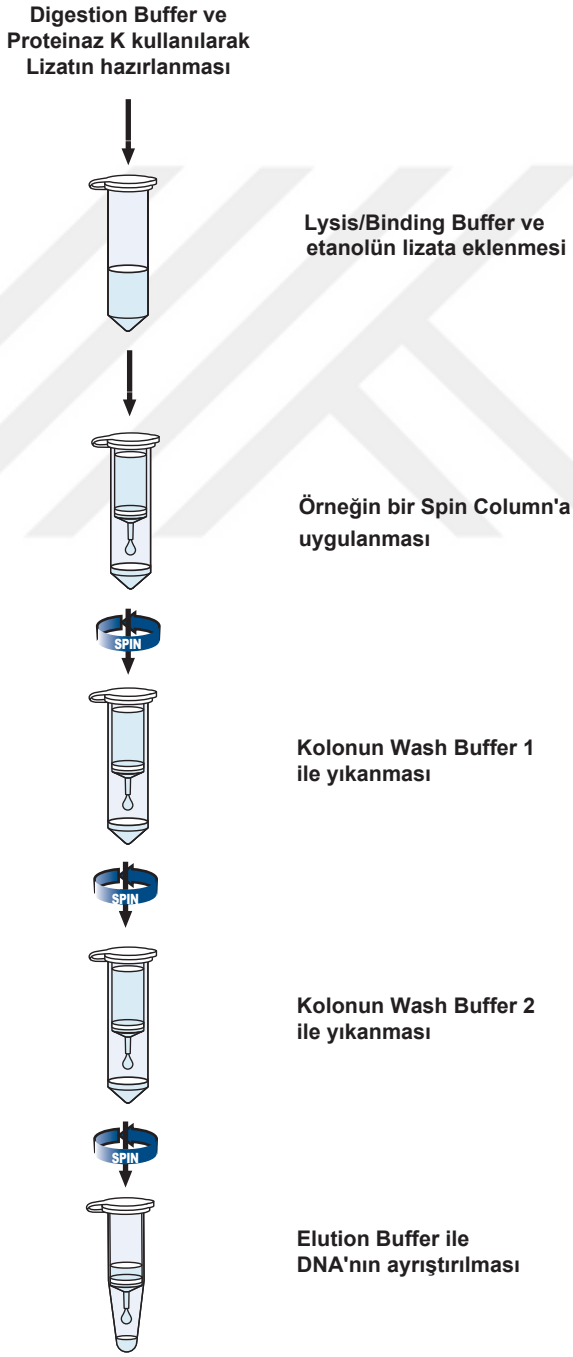
Bistüri: 20, Broche, Çin

H_2O: Nuclease Free Water, Thermo Scientific, ABD

YÖNTEMLER

DNA İzolasyonu

Çalışmada gereksinim duyulan ölçümleri yapabilmek için ilk olarak hastalardan elde edilmiş dokuların ve buccal swabların içeriğindeki hücrelerden DNA izolasyonları gerçekleştirildi. PureLink® Genomic DNA Mini Kits kullanılarak gerçekleştirilen saflaştırma prosedürü, Şekil 5'te gösterildiği gibidir.



Şekil 5. Çeşitli dokulardan DNA saflaştırma prosedürü

1- Mini kit ile lizatların hazırlanması:

A- Memeli dokusu lizatı hazırlama:

1. Isı bloğu 55˚C olacak şekilde hazırlandı.
2. 25 mg'dan az miktarda larinks biyopsi materyali steril cam üzerinde steril bistüri ile mümkün olan en küçük parçacıklara ayrışana dek ince ince kıyıldı. Her biri ayrı ayrı steril mikrosentrifüj tüplerine kondu.
3. Mikrosentifüj tüplerindeki materyallerin üzerine 180 µL PureLink® Genomic Digestion Buffer ve 20 µL Proteinaz K eklendi. Dokunun sıvı içerisinde tümüyle batması sağlandı.
4. Karışım, 55˚C sıcaklıktaki ısı blokları kullanılarak inkübasyona bırakıldı. Ara sıra vortekslenerek parçacıkların dağılması hızlandırılmaya çalışıldı. Yaklaşık 1 ila 4 saat arası bir zamanda karışımın gözle görülebilen tüm parçacıklardan arınması sağlandı.
5. Lizatı tüm partiküllerden arındırmak adına tüpler, oda sıcaklığında 3 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatan kısımlar steril yeni mikrosentrifüj tüplerine aktarıldı.
6. Lizata 20 µL RNaz A eklenerek kısaca vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
7. Lizata 200 µL PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.
8. Lizata 200 µL 99% saflıkta etanol eklendi. 5 saniye boyunca iyice vortekslendi.
9. Derhal DNA Saflaştırma Prosedürü adımındaki DNA bağlama işlemine geçildi.

B- İnsan bukkal swab lizatı hazırlama:

1. Isı bloğu 55˚C olacak şekilde hazırlandı.
2. Bukkal swab 2 mL'lik steril mikrosentrifüj tüp içerisine kondu. Örneğin üzerine 400 µL PBS eklendi.
3. Lizata 20 µL Proteinaz K eklendi.
4. Pipetlenerek iyice karıştırıldı ve Proteinaz K'lı swab lizatı yeni bir steril mikrosentrifüj tüpe yerleştirildi.
5. Tüpteki lizatlara eşit hacimde PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vorteksle iyice karıştırıldı.

6. Karışım, 55˚C sıcaklıktaki ısı blokları kullanılarak en az 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Tüp kapaklarını ıslatan az miktardaki lizatı tüpte indirmek için kısaca santrifüj yapıldı.
8. Lizata 200 µL 99% saflıkta etanol eklendi. Homojen bir eriyik elde etmek için 5 saniye boyunca iyice vortekslendi.
9. Derhal DNA Saflaştırma Prosedürü adımındaki DNA bağlama işlemine geçildi.

2- DNA saflaştırma prosedürü:

A- DNA bağlama:

1. DNA'ları bağlanacak örnek sayısı kadar PureLink® Spin Column in Collection Tube hazırlandı
2. PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer ve etanol ile hazırlanmış olan takribi 640 µL lizat PureLink® Spin Column içine kondu.
3. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüj edildi.
4. Toplama tüpü (collection tube), içine biriken sıvı ile birlikte atıldı ve kolon (spin column) kitin içinde bulunan temiz boş bir PureLink® Collection Tube içine yerleştirildi.
5. DNA Yıkama basamağına geçildi.

B- DNA yıkama:

1. Kolona 500 µL etanol ile hazırlanmış Wash Buffer 1 eklendi.
2. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüj edildi.
3. Toplama tüpü (collection tube), içine biriken sıvı ile birlikte atıldı ve kolon (spin column) kitin içinde bulunan temiz boş bir PureLink® Collection Tube içine yerleştirildi.
4. Kolona 500 µL etanol ile hazırlanmış Wash Buffer 2 eklendi.
5. Oda sıcaklığında 3 dakika boyunca maksimum ivmede santrifüj edildi. Toplama tüpü (collection tube), içine biriken sıvı ile birlikte atıldı.
6. DNA Ayrıştırma basamağına geçildi

C- DNA ayrıştırma:

1. Kolonlar 1,5 mL'lik mikrosentrifüj tüplerine yerleştirildi.
2. Kolona 75 µL PureLink® Genomic Elution Buffer eklendi.

3. 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca maksimum ivmede santrifüj edildi.
4. Daha fazla DNA kurtarabilmek adına kolon, yine aynı ayrıştırma tamponu bu kez 50 µL kullanılarak başka bir mikrosentrifüj tüpüne yerleştirildi.
5. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca maksimum ivmede santrifüj edildi.
6. Mikrosentrifüj tüplerinde saflaştırılmış DNA korundu, kolonlar çıkarılıp atıldı.

D- DNA saklama:

1. Saflaştırılan DNA, daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere -20˚C'de saklandı.

Spektroskopik Yöntemlerle DNA Miktar ve Saflığının Belirlenmesi

Bir çözelti içindeki DNA miktarının belirlenmesinde çözeltinin 260 nm ve 280 nm dalgaboylarındaki ışınlara olan geçirgenliği ölçülerek sayısal bir orana başvurulur. Oligonükleotidlerin miktarları genellikle OD ile ifade edilir. Bir OD; optik yol uzunluğu 1 cm olan bir küvette, optik yoğunluğu 1 olarak sonuçlanan, 1 ml hacim içerisindeki oligonükleotide tekabül eder (47).

Elde edilen çözeltinin spektrofotometrik analizinde 260:280 oranının 1,8 civarında ölçülmesi halinde DNA saflığının yeterli düzeyde olduğu kabul edilir. Bu oranın daha düşük seviyelerde ölçülmesi, çözeltinin içerisinde yüksek miktarda protein, fenol ya da 280 nm dalgaboyunda absorblanan başka bulaş içeriklerinin olabileceğini gösterir (47). Oranın daha yüksek ölçülmesi halinde ise içerikte kayda değer miktarda RNA mevcut olduğu düşünülebilir. Bunun başlıca nedeni RNA molekülünde yer alan nükleotid farkıdır. Örnek içeriğindeki nükleotid karışım oranı; beş nükleotidin her biri bağımsız olarak 1,15 ila 4,50 oranlarını gösterebildiklerinden dolayı 260:280 oranını geniş ölçekte etkileyebilmektedir (48).

Öte yandan örnek asiditesindeki farklılıklar da 260:280 oranında çeşitliliğe yol açabilir. Asidik çözeltilerin 260:280 oranını 0,3 kadar düşük gösterebileceği gibi, bazik çözeltilerin de 0,3 kadar yüksek gösterebileceği saptanmıştır (49).

Lizatlardan DNA izolasyonunun ardından spektrofotometrik yöntemlerle saflık ve konsantrasyon tayini, bisülfit modifikasyonu yapılmasında sülfonasyon işleminin mutlak başarıya ulaşması açısından önem arz etmektedir (48). Kullanılan bisülfit modifikasyon kitinin örnek başına önerdiği optimal DNA miktarı 200 ng ile 500 ng arasındadır. Bu çalışmada kullanılan örneklerde de söz konusu optimal aralıktaki miktarlarla çalışabilmek adına distile su kullanılarak konsantrasyon denkleştirmesi yapılmıştır. Bisülfit modifikasyonu yapılırken her örneğe yaklaşık olarak 350 ng (±50 ng) DNA gelecek şekilde denkleştirme yapılmıştır.

DNA'larda Bisülfit Modifikasyonu

Üzerinde çalışılmak istenen DNA yeterli saflıkta elde edildikten sonra metilasyon analizi yapabilmek adına sodyum bisülfit kullanılarak DNA üzerinde hedeflenen bazların değiştirilmesi mümkündür. Bisülfit reaksiyonu esnasında metillenmemiş tüm sitozinler urasile dönüştürülürken metillenmiş sitozinlerde bu dönüşüm gerçekleşmez. Başarı ile tamamlanmış bir bisülfit dönüşümünün ardından elde edilen zincirde metillenmemiş halde hiçbir sitozin kalmamış olur. Bu zincirde yer alan urasil bazlarının yerine ise PCR reaksiyonu sonrasında timin bazları yerleşir (Tablo 4).

Tablo 4. Bisülfit modifikasyonu

Taslak zincir	C	Cm	G	T	A	Cm	C	T
Bisülfit modifikasyonu sonrası	U	Cm	G	T	A	Cm	U	T
PCR sonrası	T	C	G	T	A	C	T	T

Modification Reagent hazırlanışı

1. Bir flakon kuru Modification Reagent içerisine 0,9 mL distile su, 200 µL Modification Solution I ve 60 µL Modification Solution II eklendi
2. 10 dakika boyunca orbital shaker ile karıştırıldı.

Bisülfit modifikasyonu işlem protokolü

1. İzole DNA materyalleri her 20 µL'lik örnekte 350 ng DNA bulunacak şekilde denkleştirilerek PCR tüplerine aktarıldı.
2. Önceden hazırlanmış Modification Reagent çözeltisinden 120 µL her bir PCR tüpüne eklendi. Aşağı yukarı pipetleme yapılarak karıştırıldı.

3. Tüpler thermal cycler içine yerleştirildi. 10 dakika boyunca 98˚C sıcaklıkta ve hemen ardından 150 dakika boyunca 60˚C sıcaklıkta tutuldu.
4. DNA Purification Micro Column içerisine 400 µL Binding Buffer eklendi.
5. Dönüştürülmüş olan DNA örneği Binding Buffer içerisine eklendi ve pipetlenerek tamamen karıştırıldı.
6. 12.000 rpm ivmesinde 30 saniye santrifüj edildi. Kolondan aşağı süzülen akı atıldı.
7. 200 µL Wash Buffer eklendi ve 12.000 rpm ivmesinde 30 saniye santrifüj edildi. Kolondan aşağı süzülen akı atıldı.
8. 200 µL Desulfonation Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika bounca beklemeye bırakıldı.
9. 200 µL Wash Buffer eklendi ve 12.000 rpm ivmesinde 30 saniye santrifüj edildi. Kolondan aşağı süzülen akı atıldı.
10. Bir kez daha 200 µL Wash Buffer eklendi ve 12.000 rpm ivmesinde bu kez 60 saniye santrifüj edildi. Kolondan aşağı süzülen akı atıldı.
11. Kolon 1,5 ml hacminde steril bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. 10 µL Elution Buffer eklendi ve 12.000 rpm ivmesinde 60 saniye santrifüj edildi.
12. Ayrıştırılan dönüştürülmüş DNA örnekleri -20˚C sıcaklıkta saklandı.

Metilasyon Spesifik PCR

Metilasyon Spesifik PCR (MSP), modifiye edilmiş DNA örneklerinde metile ve metile olmayan bölgelere özel primerler yardımı ile yapılan PCR işlemidir (50). Bisülfit modifikasyonu tamamlanmış DNA'ların, metillenmiş CpG adacıklarından yoğun bölgelere has tasarlanan metil spesifik primerler ve metile olmayan CpG adacıklarından yoğun bölgelere has tasarlanan unmetile spesifik primerler (Tablo 5) kullanılarak, hedeflenen DNA bölgesi PCR yardımı iki farklı protokol (Tablo 6 ve Tablo 7) ile çoğaltıldı.

PCR işlemlerinde yer alan annealing basamağındaki en uygun sıcaklığı tespit etmek için gerek metile gerekse metile olmayan primerler için sıcaklık gradiyenti yapıldı. Bant yoğunluğunun en iyi görüldüğü sıcaklık tespit edilerek uygulama standardize edildi.

Tablo 5. SMAD4 gen bölgesinin metillenme analizinde kullanılan primerler (51)

Metile Reaksiyon	Forward	5'-GTAATAATA**CG**GTTTTGGT**CG**TC-3'
	Reverse	5'-CTCCCACCCCCTAAA**CG**AC**CGCG**-3'
Unmetile Reaksiyon	Forward	5'-GTAATAATA**TG**GTTTTGGT**TG**TT-3'
	Reverse	5'-CTCCCACCCCCTAAA**CA**AC**CACA**-3'

Tablo 6. Metillenmiş dizilere has PCR reaksiyonu protokolü

PCR karışımı (her bir örnek için)	• 12 µL Master Mix • 0,25 µL Primer Methylated Forward • 0,25 µL Primer Methylated Reverse • 11 µL Nuclease Free H_2O • 2 µL DNA
Protokol	1. 95˚C 5’ 00” 2. 95˚C 0’ 45” 3. 55˚C 1’ 30” 4. 72˚C 1’ 30” 5. 2. basamaktan 4. basamağa kadar 25 kez tekrar 6. 72˚C 4’ 00” 7. 4˚C saklama

Tablo 7. Metillenmemiş dizilere has PCR reaksiyonu protokolü

PCR karışımı (her bir örnek için)	• 12 µL Master Mix • 0,25 µL Primer Unmethylated Forward • 0,25 µL Primer Unmethylated Reverse • 11 µL Nuclease Free H_2O • 2 µL DNA
Protokol	1. 95˚C 5’ 00” 2. 95˚C 0’ 45” 3. 52˚C 1’ 30” 4. 72˚C 1’ 30” 5. 2. basamaktan 4. basamağa kadar 25 kez tekrar 6. 72˚C 4’ 00” 7. 4˚C saklama

Agaroz Görüntüleme ile Sonuçların Değerlendirilmesi

Nükleik asit moleküllerinin uzunluğuna göre ayrışarak nicel değerlendirmenin sağlanabilmesi için elektroforezde uygun ortamı sağlayacak agaroz jel, mikrodalga fırında 50 ml 1x TAE tampon içerisinde çözdürülmüş 1 gr agaroz jel tozu kullanılarak hazırlandı. Yaklaşık 70 saniyelik fırınlamanın ardından berrak bir çözelti elde edildiğinde çözeltiye 3 µL etidyum bromür eklendi ve iyice karıştırılarak kalıba döküldü.

Jel katılaştıktan sonra, 1x TAE tamponla dolu elektroforez tankına tamamen batırıldı. PCR işlemi ile çoğaltılan DNA'lardan 5µL, kuyulara DNA yükleme boyası (Blue Juice) ile boyanarak enjekte edildi. 100 bç ölçekteki marker da boyanarak boş kuyulardan birine enjekte edildi.

PCR ile amplifiye edilen tüm örnekler bahsi geçen standartla %2 derişimde hazırlanan agaroz jelde yürütüldü. Gerilimi 110 V olacak şekilde ayarlanan elektroforez tankında yaklaşık 35 dakika yürütülen örnekler UV lamba altında görüntülendi, fotoğraflandı ve UV gel imager (MiniBIS Pro) ile kayıt altına alındı.

İstatistik Analiz

Çalışmadan elde edilen bant yoğunluğu verileri lisanslı bir SPSS yazılımına girildi. Değişken hesaplamaları, tanımlayıcı istatistik ve istatistik analiz tabloları, boxplot ve scatter grafikleri, SPSS yazılımı üzerinde yapılarak bu tez dosyasında gerekli yerlere olabildiğince uygun şekilde Türkçeleştirilerek aktarıldı. İstatistik analizlerde hesaplanan p değerlerinin 2 standart sapma dışında kalması ($p<0,05$) anlamlı kabul edildi.

Deneysel basamaklardan elde edilen verilerin istatistik analizinde hedef sorgulamayı belirlemek için oluşturulan hipotezler kuruldu:

- H_0: Gruplar arasında bant yoğunluk düzeyleri açısından anlamlı bir fark yoktur.
- H_1: Grupların bant yoğunluk düzeyleri birbirlerinden anlamlı düzeyde farklıdır.

Hipotezlerde bahsi geçen farkı tespit edebilmek için Şekil 6'da gösterilen parçalı fonksiyon oluşturuldu.

$$f(H) = \begin{cases} H_0\,, & \dfrac{bm}{bu} = \dfrac{xm}{xu} \\ H_1\,, & \dfrac{bm}{bu} \neq \dfrac{xm}{xu} \end{cases}$$

Şekil 6. Hipotezlerin parçalı fonksiyon yardımıyla matematiksel ifadesi (**bm:** Kontrol dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu, **bu:** Kontrol dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu, **xm:** Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu, **xu:** Tümör dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu)

Deneysel basamaktaki dört veri grubunun hasta ve kontrol grupları arasındaki metilasyon değişimini araştırmak için istatistik analiz yazılımı içerisinde hesaplama yoluyla yeni bir değişken üretildi. Bu yeni değişken ile diğer üç veriden yola çıkarak hasta grubun metillenmiş bant yoğunluğunun H_0 hipotezi gereğince öngörülen değeri saptanmaya çalışıldı. Bu amaçla kontrol gruplarının metillenmiş ve metillenmemiş bant yoğunluklarının oranı ile

hasta grubunun metillenmemiş bant yoğunluğunun çarpılarak exp_xm olarak ifade edilen bir beklenen değerler grubu oluşturuldu. Bu değerin matematiksel ifadesi Şekil 7'de görülebilir.

$$exp_xm = \frac{bm}{bu} \times xu$$

Şekil 7. Tümör dokusunun beklenen metillenmiş bant yoğunluğu değerinin matematiksel ifadesi (**exp_xm:** Tümör dokusunun beklenen metillenmiş bant yoğunluğu, **bm:** Kontrol dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu, **bu:** Kontrol dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu, **xu:** Tümör dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu)

Tümör dokusunun beklenen ve gerçek metillenmiş bant yoğunlukları arasındaki kıyasın istatistik analiz yazılımı yardımıyla uygun dağılım grafiklerine dökülebilmesi amacıyla söz konusu değerler bir oran olarak yazılıma ifade edildi. Yine bu oran da uygun formül ile yazılıma tanımlanarak hesaplatıldı. Yazılıma girilen formül Şekil 8'de göserildiği gibidir. Bu formülden yapılan hesaplamada elde edilen değer <1 bulunduğunda tümör dokusunun beklenen değere göre hipometile, >1 bulunduğunda ise hipermetile olduğu sonucuna varıldı.

$$real_per_exp_xm = \frac{xm}{exp_xm}$$

Şekil 8. Tümör dokusunun gerçek metillenmiş bant yoğunluğunun beklenen değere oranının matematiksel ifadesi (**real_per_exp_xm:** Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değerinin beklenen değere oranı**, xm:** Tümör dokusunun gerçek metillenmiş bant yoğunluğu, **exp_xm:** Tümör dokusunun beklenen metillenmiş bant yoğunluğu)

İstatistik analizde kullanılacak testin en doğru şekilde belirlenmesi için şu sorulara cevap arandı (52):

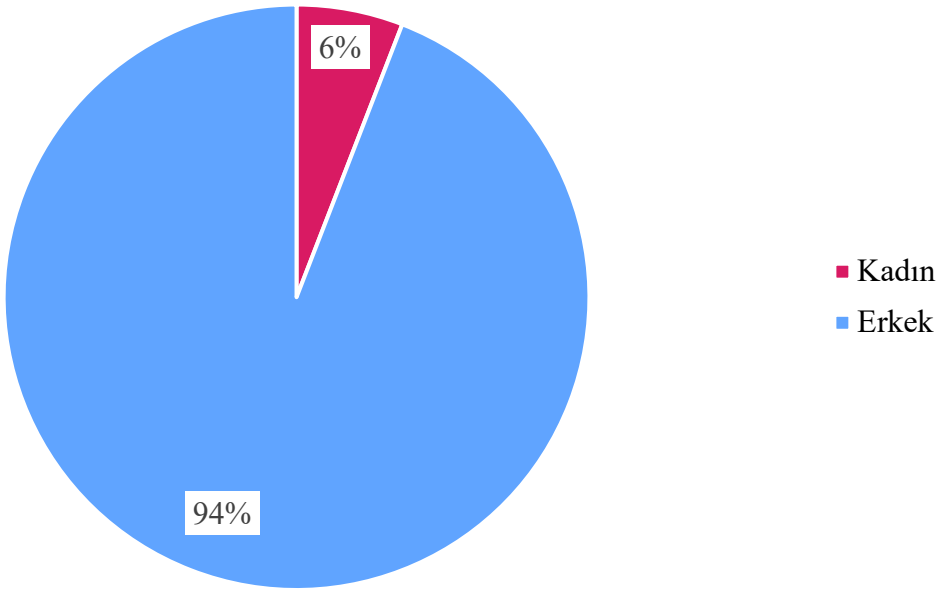
- Değişkenlerin türleri neler?
- Değişkenler sürekli mi?
- Değişken grup sayısı kaç?
- Gruplar birbiri ile bağımlı mı?
- Değişkenler normal dağılıma uyuyor mu?

Mevcut verilerilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk normallik testi ile analiz edildi (53). Shapiro-Wilk testi istatistik yazılımına yaptırıldı.

BULGULAR

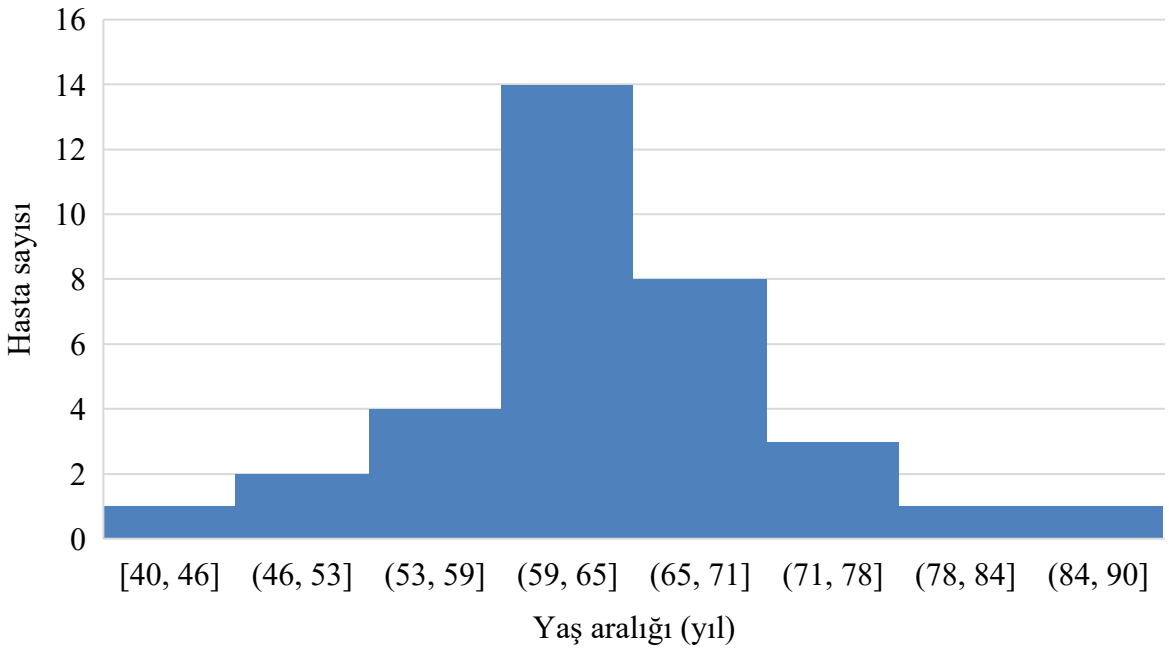
Larinks kanseri tanısı almış hastalarda *SMAD4* gen bölgesinin metillenme analizini yapma amacıyla gerçekleştirilen çalışmaya uygun kriterlerde 34 hasta dahil edildi.

Çalışmaya dahil olan 34 hastanın yalnızca 2 tanesi kadın olup 32 tanesi erkektir. Örneklem kümesinin cinsiyet dağılım grafiği Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Cinsiyet dağılım grafiği

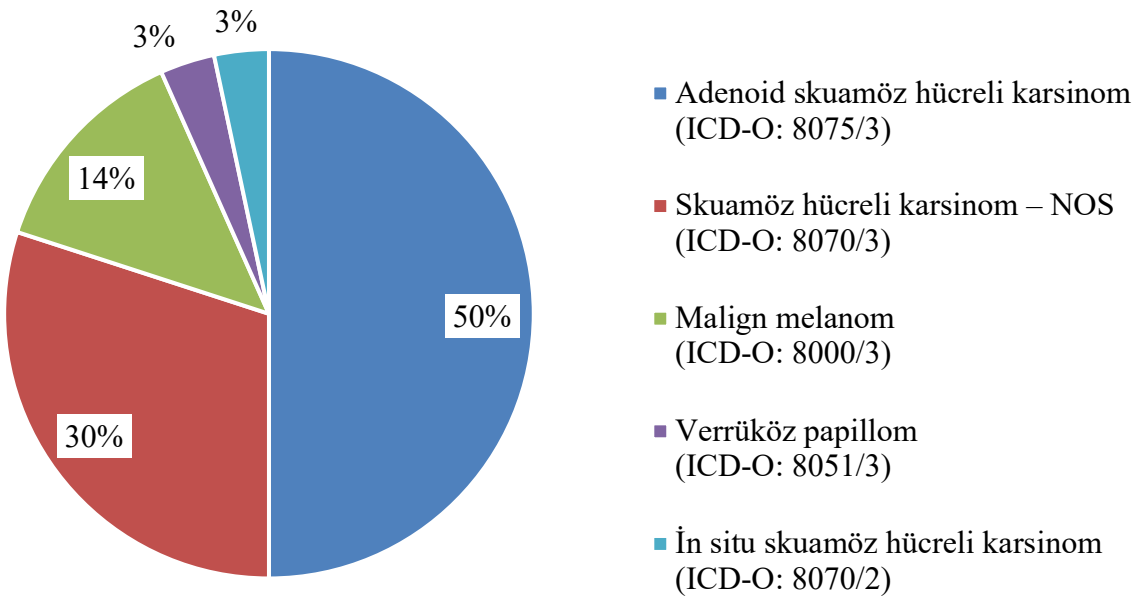
Çalışmaya dahil olan hastaların yaşları patolojik olarak ilk kez tanı aldıkları tarih esas alınarak tasnif edilmiştir. Buna göre çalışmaya katılan hastalardan en genç yaşta tanı alanı 40 yaşında, en ileri yaşta tanı alan hasta ise 90 yaşındadır. Çalışmaya dahil hastaların 14 tanesi ise 59 ila 65 yaşları arasında tanı almışlardır. Örneklem kümesinin yaş dağılımı Şekil 10'daki histogramda görselleştirilmiştir.



Şekil 10. Yaş dağılım grafiği

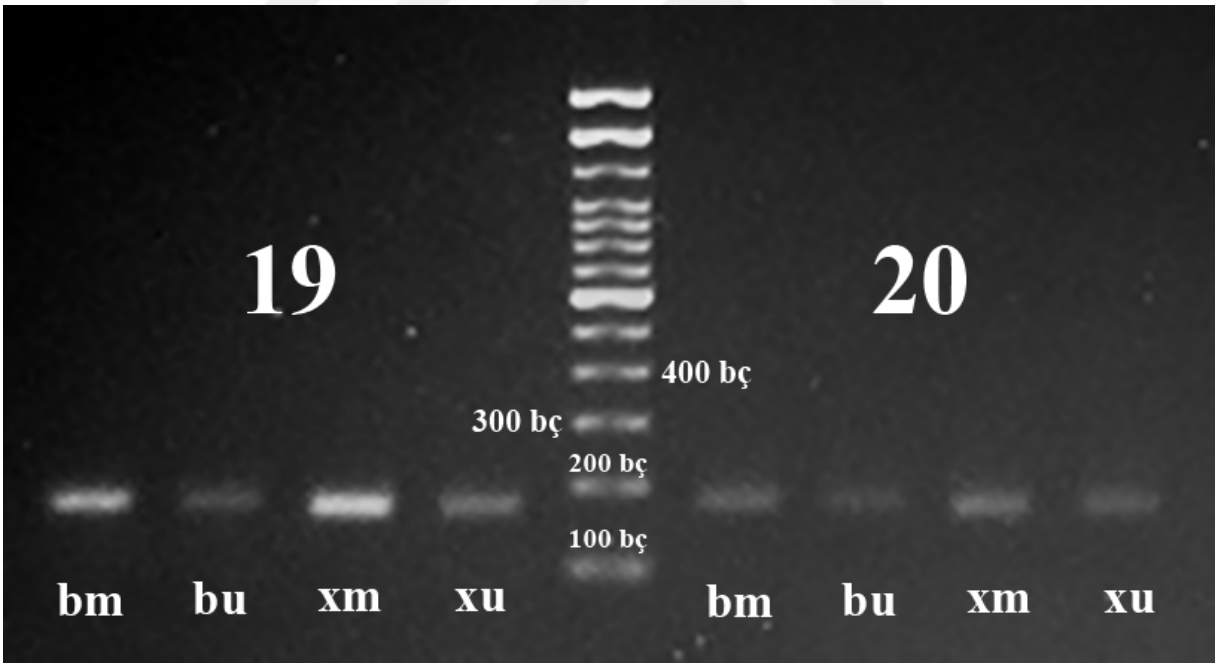
Patoloji raporları ile teyit edilen verilere göre çalışmada yer alan hastaların bir tanesinde tümör lokasyonu vokal kord olarak diğerlerine görece daha detaylı belirtilerek kayıt altına alınmışır. Vokal kordun larinksin glottik bölgesinde yer alması sebebiyle ICD-O kodlama sistemine göre 32.0 olarak kodlanmıştır. Diğer hastaların tümör tespit edilen dokuları larinkste yer almakla birlikte yerleşim bölgeleri detaylı olarak tanımlanamamıştır. Buna bağlı olarak yine ICD-O kodlama sistemindeki hali ile başka biçimde tanımlanamayan anlamına gelen "Not Otherwise Specified (NOS)" olarak ifade edilmiş ve 32.9 olarak gösterilmiştir.

Yine patoloji raporlarındaki verilere göre tümör dokularının tespit edilen morfolojik yapıları taranmıştır. 4 hastanın tümör dokusundaki morfolojik taksonomi kesin olarak belirlenememiştir. Diğer 30 hastanın ise 15'inde Adenoid skuamöz hücreli karsinom (8075/3), 9'unda Skuamöz hücreli karsinom – NOS (8070/3), 4'ünde Malign neoplazm (8000/3), 1'inde Verrüköz papillom (8051/3) ve 1'inde ise İn situ skuamöz hücreli karsinom – NOS (8070/2) olarak kodlanan morfolojiler saptanmıştır. Bulguların şematik gösterimi Şekil 11'de gösterildiği gibidir.



Şekil 11. Tümör dokularının morfolojik biçimlerin dağılımı

Larinks kanserli hastalarda *SMAD4* geninin metillenme oranlarının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada öncelikle toplanan doku örneklerinden DNA izolasyonları yapıldı. Diğer lizat bileşenlerinden ayrıştırılan DNA'lar spektrofotometrik denkleştirme yapılarak bisülfit ile seçici modifikasyona uğratıldı. Sonuçta elde edilen modifiye DNA'lar, metillenmiş ve metillenmemiş bölgelerin çoğaltılma esasına dayanan, metilasyon spesifik PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Her iki biçimde ayrı ayrı çoğaltılan DNA'lar boyanarak agaroz jel içerisine yerleştirilerek doğru akım uygulanmış tampon dolu tankta yürütüldü. Jel içerisinde yeterli mesafenin alındığının görülmesiyle birlikte jeller UV ışık altında görüntülendi ve UV jel fotoğraflayıcı cihaz ile kayıt altına alındı. Kayıt altına alınan görüntülerin bir örneği Şekil 12'de gösterildiği gibidir. Elde edilen jel görüntüleri bilgisayar ortamında analiz edildi, yazılım yardımıyla bant yoğunlukları hesaplandı. Bantların molekül ağırlıkları kullanılan 100 bç'lik markera göre kalibre edilerek ölçüldü. Tüm bantların 180 bç civarında görüldüğü kaydedildi.



Şekil 12. Larinks kanseri tanısı almış iki farklı hastanın SMAD4 gen bölgesinin metilasyon analizi (**bm:** Kontrol dokusunun metillenmiş bant görüntüsü, **bu:** Kontrol dokusunun metillenmemiş bant görüntüsü, **xm:** Tümör dokusunun metillenmiş bant görüntüsü, **xu:** Tümör dokusunun metillenmemiş bant görüntüsü)

Hastaların kontrol ve tümör dokuları, metillenmiş ve metillenmemiş PCR işlemleri yardımıyla incelendiğinde elde edilen veri dağılımı Tablo 8'de gösterildiği gibidir.

Tablo 8. Çalışmaya dahil hastaların veri dağılımı

		bm	bu	xm	xu
N	**Geçerli**	34	34	34	34
	Kayıp	3	3	3	3
Aritmetik ortalama		,36894	,38653	,55074	,40403
Standart hata		,035766	,038715	,053465	,048916
Ortanca		,36050	,39150	,62300	,37200
Standart sapma		,208551	,225744	,311752	,285226
Varyans		.043	.051	.097	.081
Dağılım genişliği		,799	,778	,951	,938
En küçük değer		,001	,001	,001	,001
En büyük değer		,800	,779	,952	,939
Persantiller	**25**	,24275	,21450	,19925	,17700
	50	,36050	,39150	,62300	,37200
	75	,52700	,53225	,83000	,54125

N: Çalışmaya dahil hasta sayısı;

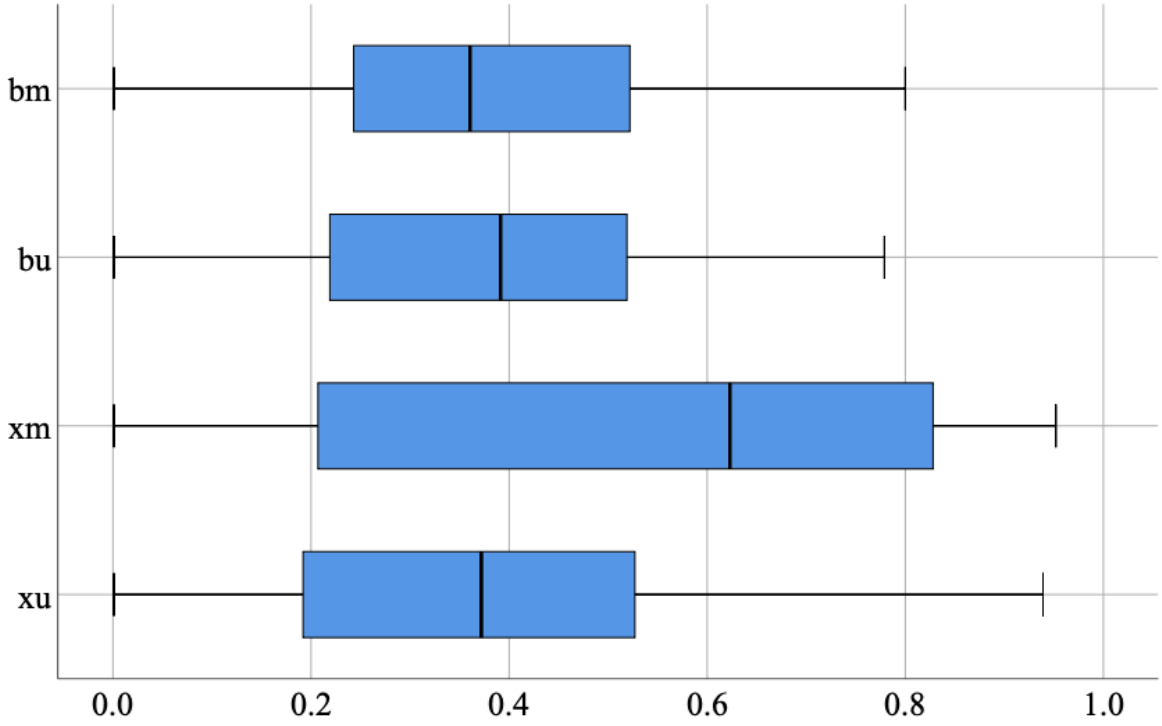
bm: Kontrol dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu;

bu: Kontrol dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu;

xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu;

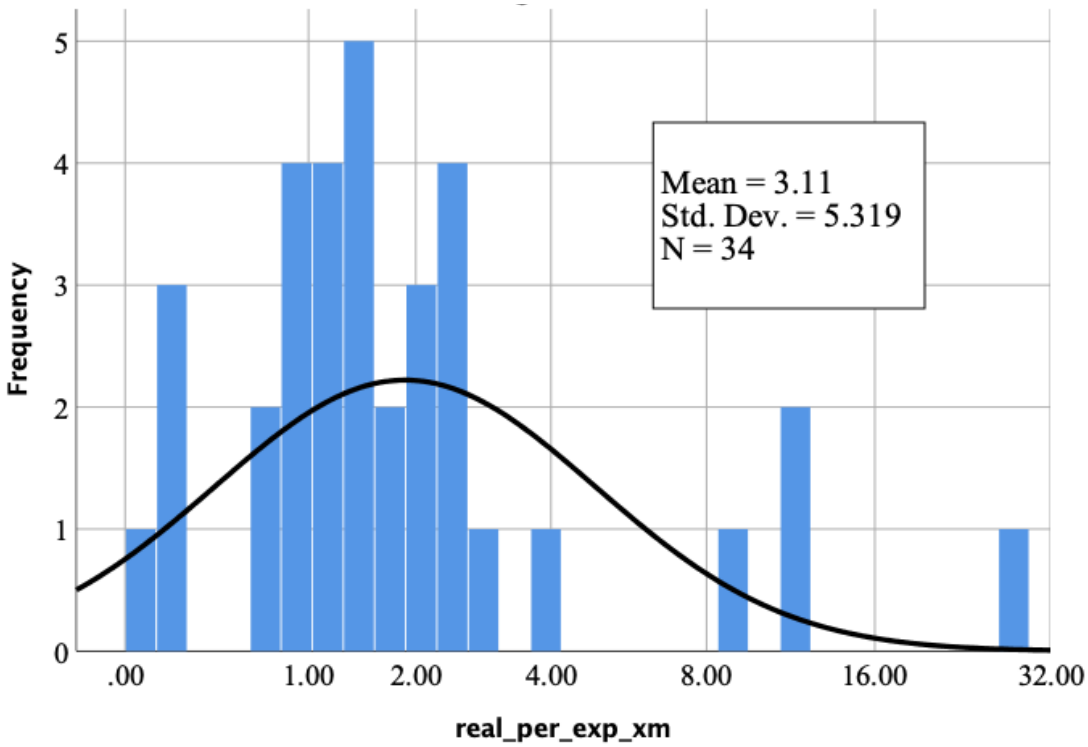
xu: Tümör dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu.

Bu verileri görselleştirerek ifade etmek adına oluşturulan boxplot grafiği Şekil 13'te gösterilmiştir. Boxplot grafiğinde en küçük ve en büyük değerler, çeyrekler açıklığı ve ortanca değer yer almaktadır.



Şekil 13. Bant yoğunluklarının doku örneklerine göre dağılımı (50. persantil çizgileri ortanca değerlerini gösterir, **bm:** Kontrol dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu, **bu:** Kontrol dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu, **xm:** Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğu, **xu:** Tümör dokusunun metillenmemiş bant yoğunluğu)

Her bir hastanın tümör dokusundaki metillenmiş bölgelerin yoğunluğundaki değişimin tespit edilmesi amaçlandı. Metillenmiş kontrol dokularının sayısal değerleri metillenmemiş kontrol dokularının sayısal değerlerine bölündü. Her hasta için ayrı ayrı hesaplanan oranlar, metillenmemiş tümör dokularının sayısal değerleri ile çarpılarak metillenmiş tümör dokuları için beklenen olası bant yoğunluğu için sayısal bir değer elde edildi. Metillenmiş tümör dokularının gerçek değerlerinin, hesaplanan beklenen değerlere oranlanması ile kontrol dokulara göre tümör dokularındaki değişim hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 14'teki histogramda ve Tablo 9'da özetlenmiştir.



Şekil 14. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin histogram ile ifadesi (**real_per_exp_xm:** Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değerinin hesaplanan değere oranı)

Sonuçta 10 hastanın tümör dokusundaki gerçek bant yoğunluğunun beklenenden düşük, 24 hastanın ise tümör dokusundaki gerçek bant yoğunluğunun beklenenden yüksek olduğu saptandı. Değişimin aritmetik ortalaması 3,1081 değerinde bulunarak tümör dokularında metilasyon artışı lehine bulgu verdi. Ayrıca ortanca değer de 1,4245 değerinde bulunarak aritmetik ortalama ile benzer şekilde tümör dokularında metilasyon artışına işaret etti. Çarpıklık değeri pozitif yönde 3,681 düzeyinde görülerek mod değerin oldukça üzerinde asimetrik dağılan örnekleri gösterdi.

Tablo 9. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin istatistiki verileri

		İstatistik	Standart Hata
N	Geçerli	34	
	Kayıp	3	
Ortalama		3.1081	.91213
Ortanca		1.4245	
Standart sapma		5.31858	
Varyans		28.287	
Çarpıklık		3.681	.403
Basıklık		15.294	.788
Açıklık		28.09	
Çeyrekler açıklığı		1.55	
En küçük değer		.06	
En büyük değer		28.16	
Persantiller	25	.9012	
	50	1.4245	
	75	2.4392	

Her hastanın metillenmiş tümör dokularının gerçek değerlerinin, hesaplanan beklenen değerlere göre değişiminin anlamlılığı da incelendi. Bu inceleme için öncelikle mevcut verilerilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilk normallik testi ile analiz edildi. Eşleştirilmiş iki sayısal verinin testlerinin parametrik olup olmadığının incelenebilmesi için iki sayısal veri arasındaki farkın normal dağılıp dağılmadığına bakıldı.

Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek ile beklenen değerleri arasındaki farkın oluşturduğu veri dizisinin anlamlılığı $p<0,001$ olarak hesaplandı. Bu değer, 2 standart sapma limitlerinin dışında kaldığından ($p<0,05$) söz konusu grubun normal dağılıma uymadığı tespit edildi. Test sonucu Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Shapiro-Wilk normallik testi sonucu

	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	İstatistik	Serbestlik Derecesi	Anlamlılık	İstatistik	Serbestlik Derecesi	Anlamlılık
xm_fark	.306	34	.000	.688	34	.000

xm_fark: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek ile beklenen değerleri arasındaki fark.

Verilerilerin istatistik analiz yöntemlerini en doğru şekilde belirleyebilmek için mevcut şartlar incelendi:

- Bant yoğunluğu değişkeni, sürekli ve sayısal bir değişkendir.
- Beklenen ve ölçülen gerçek değerler olmak üzere aynı hastalar iki tekrarda incelenecektir.
- Gruplar birbiri ile bağımlıdır.
- Gruplar arasındaki fark normal dağılıma uymamaktadır.

Bu şartlar altında eldeki veriler, nonparametrik bir test olan Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi (Wilcoxon Signed Rank Test) yardımıyla analiz edilmiştir. Wilcoxon testi, bir önceki değişim analizi ile aynı sonucu vermiştir. Pozitif yönde değişim 24, negatif yönde değişim ise 10 olarak bulunmuştur. Wilcoxon testinin frekans verileri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Wilcoxon testinin çokluk dağılımı

		N	Sıralar Ortalaması	Sıralar Toplamı
xm - exp_xm	Negatif sıralar	10	16.50	165.00
	Pozitif sıralar	24	17.92	430.00
	Değişim göstermeyenler	0		
	Toplam	34		

Negatif sıralar: xm < exp_xm;
Pozitif sıralar: xm > exp_xm;
Değişim göstermeyenler: xm = exp_xm;
xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değeri;
exp_xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun beklenen değeri.

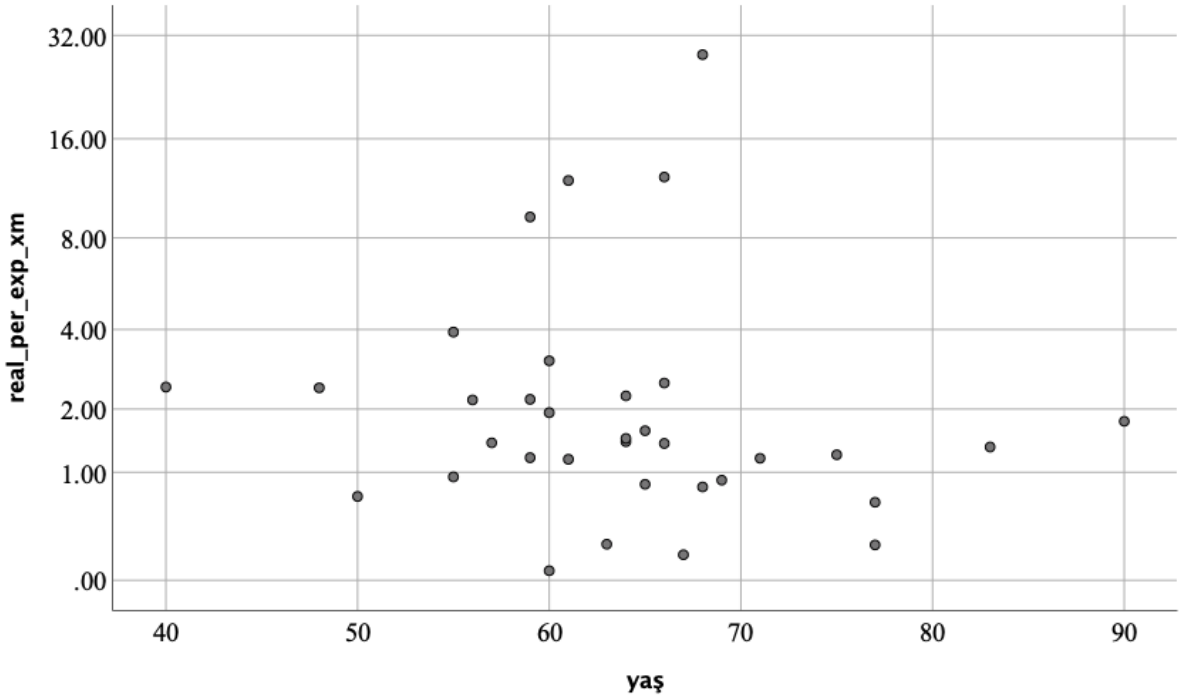
Wilcoxon testinden elde edilen sonucun anlamlılığı, Tablo 12'de görüldüğü üzere $p<0,05$ olarak bulunmuştur ($z=-2,265$ ve $p=0,023$). Bu değere göre tümör dokularından elde edilen metillenmiş bölgelerin bant yoğunluklarının gerçek değeri, hesaplanmış olan beklenen değerden anlamlı bir farklılığa sahiptir.

Tablo 12. Wilcoxon testine ait test istatistikleri

	xm - exp_xm
Z (negatif sıralar zemininde)	-2.265
Asymp. Sig. (2-tailed)	.023

xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değeri;
exp_xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun beklenen değeri.

Histopatolojik tanıları kesinleşmiş hastaların yaşları ile tümör dokularındaki metilasyon arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi yardımı ile incelendi. Hastaların yaşları ile tümör dokuları arasında negatif yönlü, yok denecek kadar zayıf bir ilişki görüldü (r=-0,10 ve p=0,957). Bu analizden elde edilen sonuçlar Şekil 15'teki saçılım grafiğinde ve Tablo 13'te özetlenmiştir.



Şekil 15. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin yaşa göre saçılım grafiği

Tablo 13. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin yaş ile korelasyonu

		yaş	real_per_exp_xm
yaş	Pearson Correlation	1	-.010
	Sig. (2-tailed)		.957
	N	37	34
real_per_exp_xm	Pearson Correlation	-.010	1
	Sig. (2-tailed)	.957	
	N	34	34

Patoloji raporlarından derlenen verilerdeki tümör dokularının dahil oldukları morfolojik sınıfa göre bant yoğunluğundaki değişim incelendi. Bu gaye için öncelikle tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değerinin hesaplanan değere oranı ve morfolojik kategori verilerinin normal dağılıma uyup uymadığına bakıldı. Tablo 14'te görüldüğü üzere her iki veri grubunun da normal dağılıma uymadığı gözlendi.

Tablo 14. Shapiro-Wilk normallik testi sonucu

	morph_code	Kolmogorov-Smirnov[a]			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
real_per_exp_xm	8075/3	.313	15	.000	.659	15	**.000**
	8070/3	.401	9	.000	.609	9	**.000**
	8000/3	.226	4	.	.943	4	.675

morph_code: Tümör dokularının dahil oldukları morfolojik sınıf;
real_per_exp_xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değerinin hesaplanan değere oranı.

Verilerilerin istatistik analiz yöntemlerini en doğru şekilde belirleyebilmek için mevcut şartlar incelendi:

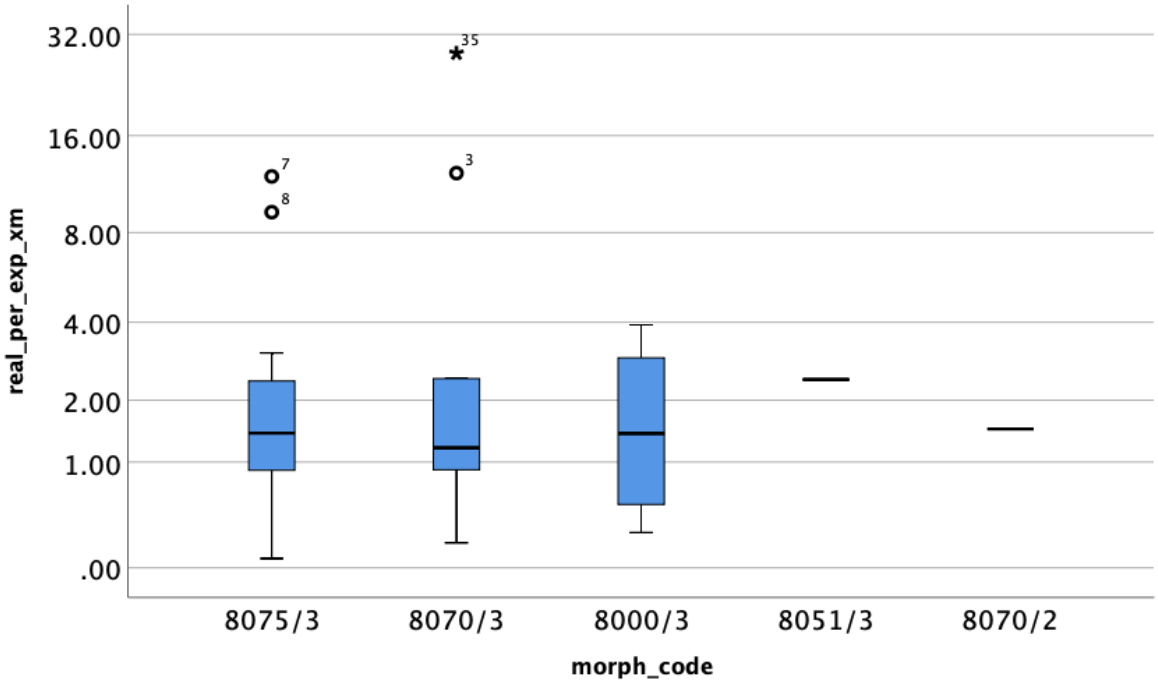
- Bant yoğunluğu değişimi, sürekli ve sayısal bir değişkendir.
- Beş grup mevcuttur.
- Gruplar birbirinden bağımsızdır.
- Gruplardan ikisi normal dağılıma uymamaktadır.

Bu şartlar altında eldeki veriler, non parametrik bir test olan Kruskal-Wallis Test ile istatistik analizin yapılmasını gerektirdi. Uygulanan Kruskal-Wallis Test sonucunda bant yoğunluğu değişimleri açısından morfolojik sınıflar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (p=0,956). Gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadığı için Post-Hoc testi yapmaya gerek duyulmadı. Test sonucu Tablo 15'te gösterildi. Bant yoğunluk değişimlerinin gruplara göre dağılımı ise Şekil 16'daki boxplot grafiği ile görselleştirildi.

Tablo 15. Kruskal-Wallis Test istatistikleri

	real_per_exp_xm
Kruskal-Wallis H	.660
Serbestlik derecesi	4
Asymp. Sig.	.956

Gruplama Değişkeni: morph_code;
real_per_exp_xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değerinin hesaplanan değere oranı;
morph_code: Tümör dokularının dahil oldukları morfolojik sınıf.



Şekil 16. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin morfolojik sınıflara göre dağılım grafiği (real_per_exp_xm: Tümör dokusunun metillenmiş bant yoğunluğunun gerçek değerinin hesaplanan değere oranı; **morph_code:** Tümör dokularının dahil oldukları morfolojik sınıf; **8075/3:** Adenoid skuamöz hücreli karsinom; **8070/3:** Skuamöz hücreli karsinom – NOS; **8000/3:** Malign melanom; **8051/3:** Verrüköz papillom; **8070/2:** İn situ skuamöz hücreli karsinom)

TARTIŞMA

SMAD4 metilasyonu ezici bir çoğunlukla pankreatik ve kolorektal kanserler üzerine çalışılan bir alandır. Bilhassa gastrointestinal kanal boyunca yer alan pek çok yapıda yüksek oranlarda *SMAD4* bölgesinde delesyonlar ve mutasyonlar gösterilmiştir (54).

Özofagial adenokarsinomların prekürsörü olan Barrett özofagusu epitelinin metaplazi, displazi, karsinom serisinin tüm evrelerinde TGF-β yanıt yeteneğinin azaldığı tespit edilmiştir. *SMAD4* promoter metilasyonu ile gen ifadesi arasında ters korelasyon görülmüştür (55).

Prostat kanserli hastalarda yapılan bir başka çalışmada her ne kadar genomik delesyonlar ya da amplifikasyonlar ispatlanamamışsa da ileri evre hastalarda *SMAD4* ifadesi azalışını net şekilde ortaya konmuştur (51).

Çeşitli lokalizasyonlara sahip farklı kökenlerden kanser dokularında *SMAD4* ifadesi incelenmiştir(51, 54-63). Tümör baskılayıcı mekanizmalarda kilit rol üstlenen *SMAD* gen ailesi ile ilgili halen aydınlatılması elzem alanlar mevcuttur.

Solunum sistemi ile ilişkili kanserler, Türkiye'de öldürücülüğü en yüksek kanser grubudur (18). Solunum sistemi bileşenlerinden larinks, embriyolojik kökeni bakımından gastrointestinal kanal ile en yakın benzerliğe sahip organdır (8). *SMAD4* gen ifadesi ile ilgili önemli sonuçlar elde edilen çalışmaların gastrointestinal kanal boyunca yoğunluk göstermesi, larinks kanserli hastaların *SMAD4* metilasyonu yönünden incelenmesinin gerekliliğini göstermektetir. *SMAD4* gen ifadesinin larinks kanserlerinde bisülfit modifikasyonu ile incelendiği, bu tez kapsamının benzeri bir çalışmaya rastlanamadığından, eksiksiz bir

kıyaslama yapabilmek oldukça güçtür. Yine de baş ve boyun lokalizasyonlu skuamöz hücreli karsinomaları üzerinde çeşitli tekniklerle *SMAD4* gen ifadesinin incelendiği çalışmalar araştırılmıştır.

Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomalı 172 tümör dokusu üzerinde, fareden mamul monoklonal anti-Smad4 antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama yöntemi ile yapılan incelemede örneklerin %22'si boyanmayarak *SMAD4* ifadesinin yokluğunu işaret etmiştir (61). Yine baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomalı 791 tümör dokusu ile yapılan *SMAD4* nükleer boyamasında örneklerin %12'sinin boyanmadığı, dolayısıyla *SMAD4* gen ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (60).

Bu tez kapsamında, larinks kanseri tanısı almış, daha önce tanımlanmış dahil olma kriterlerine uyan, dokularından yeterli miktarda DNA izole edilebilmiş, 34 hasta incelendi. Tümör dokusundaki metilasyon değişiminin 24 hastada pozitif yönlü olduğu tespit edildi. Değişimlerin sayısal olarak istatistik analizi ile elde edilen bu bulgunun anlamlı olduğu görüldü ($z=-2,265$ ve $p=0,023$).

Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın 2017 yılında yayımladığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı'na göre larinks kanseri tanısı alan kadın hastaların erkek hastalara oranı 0,09'dur (15). Bu tez çalışmasında yer alan kadın hastaların erkek hastalara oranı ise 0.06'dır. Bu bağlamda çalışmanın örneklem kümesinin cinsiyet dağılımı yönünden Türkiye Cumhuriyeti genelinde elde edilen istatistiklere uygunluğu görülmektedir.

Çalışmaya dahil olan larinks kanseri tanısı almış hastalar arasında kadın hasta sayısı çok az olduğundan, cinsiyete göre bant yoğunluğunun değişip değişmediğinin değerlendirilmesi anlamlı bulunmadığından bu konuda herhangi bir istatistiksel analiz yapılmadı.

Tümör dokularında tespit edilen metilasyon değişimlerinin hastaların tanı aldıkları yaş ile bağlantısının olup olmadığı incelendi ve bu bağlamda anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi.

Tümör dokularında tespit edilen metilasyon değişimlerinin, tümör dokularının histopatolojik inceleme ile tespit edilen, ait oldukları morfolojik sınıflar arasında bağlantı olup olmadığı incelendi ve anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Bu tez çalışmasının amacı olan larinks kanserli hastalarda, tümör dokularında kontrol grubuna göre metilasyon artışı olup olmadığı, istatistik analizler yapılarak incelendi ve

anlamlı derecede artış olduğu tespit edildi. Sonuçta test edilen hipotezlerden "H_1: Grupların bant yoğunluk düzeyleri birbirlerinden anlamlı düzeyde farklıdır." hipotezi kabul edildi.

SONUÇLAR

Bu tez çalışması larinks kanseri tanısı almış hastaların tümör dokuları ile sağlıklı bukkal epitel dokuları arasında *SMAD4* gen bölgesinin metilasyonu yönünden anlamlı bir fark olup olmadığını araştırmak amacıyla planlandı. Bunun yanı sıra histopatolojik incelemelerden elde edilen raporlar ile yaş ve cinsiyet gibi demografik verilerin de elde edilen laboratuvar bulgularıyla ilişkili olup olmadığı incelendi. Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

- Çalışmaya dahil 34 hastanın 24 tanesinde tümör dokusunda, kontrol dokusuna nazaran anlamlı düzeyde metilasyon artışı gözlenmiştir (z=-2,265 ve p=0,023).
- Tümör dokularındaki metilasyon değişimi ile hastaların tanı aldıkları yaş arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (r=-0,10 ve p=0,957).
- Tümör dokularının histopatolojik incelenmesi ile saptanmış morfolojik biçimler ve metilasyon değişimi arasında herhangi anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (p= 0,956).

Metilasyon spesifik PCR ile elde edilen bant yoğunluklarının incelenmesi esasına dayanan bu çalışmada larinks kanserlerinde metilasyon artışının anlamlı derecede gözlenmesi önemli bir bulgudur. Bu bulguyu destekleyebilecek ya da bu bulgu ile çelişebilecek herhangi bir benzer literatür bilgisine rastlanmamıştır. Yayımlanmış çalışmalar ya başka tekniklerle larinks kanserlerinde *SMAD4* ifadesini incelemektedir ya da bu tez ile benzer teknikle farklı türden kanserleri incelemektedir.

Bu bağlamda, bu tez kapsamında elde edilen, bilhassa metilasyon artışı bulgusunun benzer deney tasarımları ile sorgulanması ya da farklı tasarımlarla bu alandaki bulguların çeşitlendirilmesi, larinks kanserlerinin fizyopatolojisinin daha iyi aydınlatılmasını sağlayacaktır.

ÖZET

Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4 -*MADH4* ya da *SMAD4* olarak da bilinir- bir tümör baskılayıcı gen bölgesidir. Bu türden tümör baskılayıcı gen bölgelerinin hipermetilasyonu, organizmanın kendisinin kansere karşı ortaya koyduğu mücadelede zayıflığa yol açabilir. Pek çok bölgede gelişen kanser türünde *SMAD4* metilasyonu incelenegelmektedir. Bilhassa gastrointestinal kanal ve pankreas ile ilişkili kanserlerin *SMAD4* hipermetilasyonu ile ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Çok sayıda araştırmacının *SMAD4* ifadesi üzerine odaklanmasına karşın, larinks kanserlerinde metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonuna göre bant yoğunluklarının ölçümü esasına dayanan hiçbir yayın bulunamamıştır. Bu çalışma, larinks kanserlerinde *SMAD4* metilasyonunun rolünü aydınlatmayı hedeflemiştir.

Bu çalışmaya larinks kanseri tanısı almış otuz dört hasta dahil edilmiştir. Söz konusu araştırmayı gerçekleştirebilmek adına biyopsi materyallerinden elde edilmiş tümör dokularından ve bukkal swablar ile toplanan kontrol dokularından DNA izolasyonu yapıldı. Spektrofotometrik yöntemlerle, izole edilmiş DNA örneklerinin miktarları ve saflıkları ölçüldü. Metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu için bisülfit modifikasyonu gerçekleştirildi. Çoğaltılan tüm DNA numuneleri yatay elektroforez uygulaması için bir agaroz jele yüklendi. Bantlar ultraviyole görüntüleme kamerası altında kayıt altına alındı ve bant yoğunlukları uygun bir bilgisayar yazılımı ile ölçüldü. Elde edilen tüm sonuçlar istatistik analiz yazılımı ile incelendi.

Bu araştırma, larinks kanseri tanısı almış hastaların tümör dokularındaki *SMAD4* gen bölgesindeki metilasyon düzeyinin kontrol dokularına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiğini açıkça ortaya koymaktadır (z=-2,265 ve p=0,023).

Anahtar kelimeler: Metilasyon, *SMAD4*, Laringeal Neoplaziler, Baş ve Boynun Skuamöz Hücreli Karsinoması

AN EPIGENETIC APPROACH TO THE LARYNX CANCERS FROM THE STANDPOINT OF *SMAD4* METHYLATION

SUMMARY

Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4 -also known as *MADH4* or *SMAD4*- is a tumor suppressor gene region. Hypermethylation on these kinds of tumor suppressor gene regions may constitute a defect in the anticancer activity of organisms itself. Plenty of the sites has previously investigated by the standpoint of the *SMAD4* methylation. Especially cancers related to the gastrointestinal tract and pancreas have found associated with *SMAD4* hypermethylation. Notwithstanding numerous researchers have focused on *SMAD4* expression, there is no article found on larynx cancers based on measuring band densities due to methylation-specific polymerase chain reaction. This study aimed to clarify the role of the *SMAD4* methylation on larynx cancers.

Thirty-four patients included in this study that diagnosed as larynx cancer. To perform this research, DNA has isolated from tumor tissues by the biopsy materials and the control material by the buccal swabs. Isolated DNA samples measured for their amount and purification by spectrophotometric methods. Bisulfite modification has performed for a methylation-specific polymerase chain reaction. All the amplified DNA specimens have loaded into an agarose gel for horizontal gel electrophoresis. Bands have recorded under an ultraviolet imaging camera and band densities measured by suitable computer software. All the results have examined by the statistical analysis software.

This study manifests that there is a significant increase in the methylation levels of the *SMAD4* gene region on tumor tissues diagnosed as larynx cancer than control tissues (z=-2,265 and p=0,023).

Keywords: Methylation, *SMAD4*, Laryngeal Neoplasms, Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck

KAYNAKLAR

1. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. Robbins basic pathology. 10th ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier; 2018. 546 p.

2. Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ. Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology/diagnosis/management. 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2016. 10 p.

3. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature genetics. 2003;33 Suppl:245-54.

4. Dodge JE, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M, Li E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. Gene. 2002;289(1-2):41-8.

5. Plass C, Soloway PD. DNA methylation, imprinting and cancer. European journal of human genetics : EJHG. 2002;10(1):6-16.

6. Yıldırım M. Resimli Sistematik Anatomi. 2 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017. 450-7 p.

7. Gray H, Lewis WH. Anatomy of the human body. 20th ed. Philadelphia and New York,: Lea & Febiger; 1918.

8. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Before we are born: Essentials of embryology and birth defects. 9th edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. 127-35 p.

9. Denk DM, Swoboda H, Steiner E. [Physiology of the larynx]. Radiologe. 1998;38(2):63-70.

10. Nishimura T, Mikami A, Suzuki J, Matsuzawa T. Descent of the larynx in chimpanzee infants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;100(12):6930-3.

11. Ghazanfar AA, Rendall D. Evolution of human vocal production. Curr Biol. 2008;18(11):R457-60.

12. WHO. International Classification of Diseases for Oncology: World Health Organization; 2013. 38 p.

13. Amin MB, American Joint Committee on Cancer, Society AC. AJCC cancer staging manual. 8 ed. Chicago IL: American Joint Committee on Cancer, Springer; 2017. 155 p.

14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.

15. TCSB. Sağlık İstatistikleri Yıllığı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı; 2017. 41 p.

16. TCSB. Türkiye Kanser İstatistikleri. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı - Türkiye Halk Sağlığı Kurumu; 2017. 13 p.

17. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2019.

18. TÜİK. Ölüm Nedeni İstatistikleri - 2018. Ankara: Türkiye İstatistik Kurumu; 2019 [09.07.2020]. Available from: http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=30626.

19. Muscat JE, Wynder EL. Tobacco, alcohol, asbestos, and occupational risk factors for laryngeal cancer. Cancer. 1992;69(9):2244-51.

20. Wynder EL, Covey LS, Mabuchi K, Mushinski M. Environmental factors in cancer of the larynx. A second look. Cancer. 1976;38(4):1591-601.

21. Wynder EL, Bross IJ, Day E. A study of environmental factors in cancer of the larynx. Cancer. 1956;9(1):86-110.

22. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 1988;48(11):3282-7.

23. Salaspuro MP. Acetaldehyde, Microbes, and Cancer of the Digestive Tract. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2003;40(2):183-208.

24. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. New England Journal of Medicine. 2007;356(19):1944-56.

25. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Lancet. 2008;371(9625):1695-709.

26. Kreimer AR. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2005;14(2):467-75.

27. Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S, Monnier P. Food groups and risk of oral and pharyngeal cancer. International Journal of Cancer. 1998;77(5):705-9.

28. Easton DF, Peto J, Doll R. Cancers of the respiratory tract in mustard gas workers. Occupational and Environmental Medicine. 1988;45(10):652-9.

29. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. Am J Gastroenterol. 2001;96(7):2013-8.

30. Copper MP, Smit CF, Stanojcic LD, Devriese PP, Schouwenburg PF, Mathus-Vliegen LMH. High Incidence of Laryngopharyngeal Reflux in Patients With Head and Neck Cancer. The Laryngoscope. 2000;110(6):1007-11.

31. Waddington CH. The Epigenotype. International Journal of Epidemiology. 2012;41(1):10-3.

32. Esteller M. Epigenetics in Cancer. New England Journal of Medicine. 2008;358(11):1148-59.

33. Ramsahoye BH, Biniszkiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(10):5237-42.

34. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic acids research. 1982;10(8):2709-21.

35. Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(24):11995-9.

36. Robertson KD. DNA methylation and human disease. Nature reviews Genetics. 2005;6(8):597-610.

37. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature. 1983;301(5895):89-92.

38. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. Nature reviews Cancer. 2004;4(2):143-53.

39. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015.

40. Roth S, Laiho P, Salovaara R, Launonen V, Aaltonen LA. No SMAD4 hypermethylation in colorectal cancer. British journal of cancer. 2000;83(8):1015-9.

41. Bar-Klein G, Cacheaux LP, Kamintsky L, Prager O, Weissberg I, Schoknecht K, et al. Losartan prevents acquired epilepsy via TGF-beta signaling suppression. Annals of neurology. 2014;75(6):864-75.

42. Josephson CB, Patten SB, Bulloch A, Williams JVA, Lavorato D, Fiest KM, et al. The impact of seizures on epilepsy outcomes: A national, community-based survey. Epilepsia. 2017;58(5):764-71.

43. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1971;68(4):820-3.

44. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. Science Signaling. 2013;6(269):pl1-pl.

45. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data: Figure 1. Cancer Discovery. 2012;2(5):401-4.

46. The cBio Cancer Genomics Portal [Internet]. [cited 18.07.2020]. Available from: https://www.cbioportal.org/results/cancerTypesSummary?case_set_id=all&gene_list=SMAD4&cancer_study_list=5c8a7d55e4b046111fee2296.

47. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

48. Lehninger AL. Biochemistry : the molecular basis of cell structure and function. 2d ed. New York: Worth Publishers; 1975. xxiii, 1104 p. p.

49. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques. 1997;22(3):474-6, 8-81.

50. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996;93(18):9821-6.

51. Aitchison AA, Veerakumarasivam A, Vias M, Kumar R, Hamdy FC, Neal DE, et al. Promoter methylation correlates with reduced Smad4 expression in advanced prostate cancer. Prostate. 2008;68(6):661-74.

52. Nayak B. How to assess quality of journals and researches (Part II). Indian Journal of Ophthalmology. 2011;59(2):85-6.

53. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples)†. Biometrika. 1965;52(3-4):591-611.

54. Zhao M, Mishra L, Deng C-X. The role of TGF-β/SMAD4 signaling in cancer. International Journal of Biological Sciences. 2018;14(2):111-23.

55. Onwuegbusi BA. Impaired transforming growth factor signalling in Barrett's carcinogenesis due to frequent SMAD4 inactivation. Gut. 2006;55(6):764-74.

56. Han G, Wang X-J. Roles of TGFβ signaling Smads in squamous cell carcinoma. Cell & Bioscience. 2011;1(1):41.

57. Kim SK, Fan Y, Papadimitrakopoulou V, Clayman G, Hittelman WN, Hong WK, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene, is altered infrequently in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 1996;56(11):2519-21.

58. Kloth JN, Kenter GG, Spijker HS, Uljee S, Corver WE, Jordanova ES, et al. Expression of Smad2 and Smad4 in cervical cancer: absent nuclear Smad4 expression correlates with poor survival. Modern Pathology. 2008;21(7):866-75.

59. Roth S, Laiho P, Salovaara R, Launonen V, Aaltonen LA. No SMAD4 hypermethylation in colorectal cancer. British journal of cancer. 2000;83(8):1015-9.

60. Xie W, Aisner S, Baredes S, Sreepada G, Shah R, Reiss M. Alterations of Smad expression and activation in defining 2 subtypes of human head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2013;35(1):76-85.

61. Xie W, Bharathy S, Kim D, Haffty BG, Rimm DL, Reiss M. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. Oncol Res. 2003;14(2):61-73.

62. Xie W, Mertens JC, Reiss DJ, Rimm DL, Camp RL, Haffty BG, et al. Alterations of Smad signaling in human breast carcinoma are associated with poor outcome: a tissue microarray study. Cancer Res. 2002;62(2):497-505.

63. Yan W, Vellucci VF, Reiss M. Smad protein expression and activation in transforming growth factor-beta refractory human squamous cell carcinoma cells. Oncol Res. 2000;12(3):157-67.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Supraglottik larinks kanseri evrelemesi 7
Tablo 2. Glottik larinks kanseri evrelemesi 8
Tablo 3. Subglottik larinks kanseri evrelemesi 8
Tablo 4. Bisülfit modifikasyonu 26
Tablo 5. SMAD4 gen bölgesinin metillenme analizinde kullanılan primerler 28
Tablo 6. Metillenmiş dizilere has PCR reaksiyonu protokolü 29
Tablo 7. Metillenmemiş dizilere has PCR reaksiyonu protokolü 29
Tablo 8. Çalışmaya dahil hastaların veri dağılımı 38
Tablo 9. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin istatistiki verileri . 41
Tablo 10. Shapiro-Wilk normallik testi sonucu 42
Tablo 11. Wilcoxon testinin çokluk dağılımı 43
Tablo 12. Wilcoxon testine ait test istatistikleri 43
Tablo 13. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin yaş ile korelasyonu 44
Tablo 14. Shapiro-Wilk normallik testi sonucu 45
Tablo 15. Kruskal-Wallis Test istatistikleri 46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Larinks anatomisi 4
Şekil 2. Larinks boşluğunda yer alan ses telleri 5
Şekil 3. TGF-β öncülüğünde SMAD4 aracılığıyla kanserleşen hücrenin intihara zorlanması 14
Şekil 4. İnsan kanserlerinde saptanan SMAD4 genetik değişim frekansları 16
Şekil 5. Çeşitli dokulardan DNA saflaştırma prosedürü 21
Şekil 6. Hipotezlerin parçalı fonksiyon yardımıyla matematiksel ifadesi 31
Şekil 7. Tümör dokusunun beklenen metillenmiş bant yoğunluğu değerinin matematiksel ifadesi 32
Şekil 8. Tümör dokusunun gerçek metillenmiş bant yoğunluğunun beklenen değere oranının matematiksel ifadesi 32
Şekil 9. Cinsiyet dağılım grafiği 34
Şekil 10. Yaş dağılım grafiği 35
Şekil 11. Tümör dokularının morfolojik biçimlerin dağılımı 36
Şekil 12. Larinks kanseri tanısı almış iki farklı hastanın SMAD4 gen bölgesinin metilasyon analizi 37
Şekil 13. Bant yoğunluklarının doku örneklerine göre dağılımı 39
Şekil 14. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin histogram ile ifadesi 40
Şekil 15. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin yaşa göre saçılım grafiği 44

Şekil 16. Tümör dokularında saptanan metilasyon değişimin morfolojik sınıflara göre dağılım grafiği 46

ÖZGEÇMİŞ

Selahattin Alp TEMİZ

Doğum Tarihi: 09.11.1988

Eğitim:

2018-	Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans
2016-	Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Lisans
2011-2015	Acıbadem Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik, Lisans

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Raporu

Ek 2: Power Analizi

Ek 3: Aydınlatılmış Gönüllü Onam Formu Örneği

Ek 1: Etik Kurul Raporu

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2019/87	
	PROTOKOL ADI	Larinks Kanserlerine SMAD4 Metilasyonu Yönünden Epigenetik Bir Yaklaşım	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Dr. Öğr. Üyesi Metin BUDAK	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	**Çok Merkez Uluslararası**

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 04/20** **Tarih:25.02.2019**
	Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Metin BUDAK'ın sorumluluğunda **yapılması planlanan ve yukarıda** başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Selahattin Alp TEMİZ'in tez çalışmasının **araştırma başvuru dosyası ve ilgili** belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş; **araştırmaya ilişkin giderlerin** gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal **güvenlik** kurumuna ödetilmediği koşullarda **ve veri toplanacak yerlerden gerekli** izinler alındıktan sonra gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca **bulunmadığına mevcudun oy birliği ile** karar verilmiştir.
ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi

ÜYELER

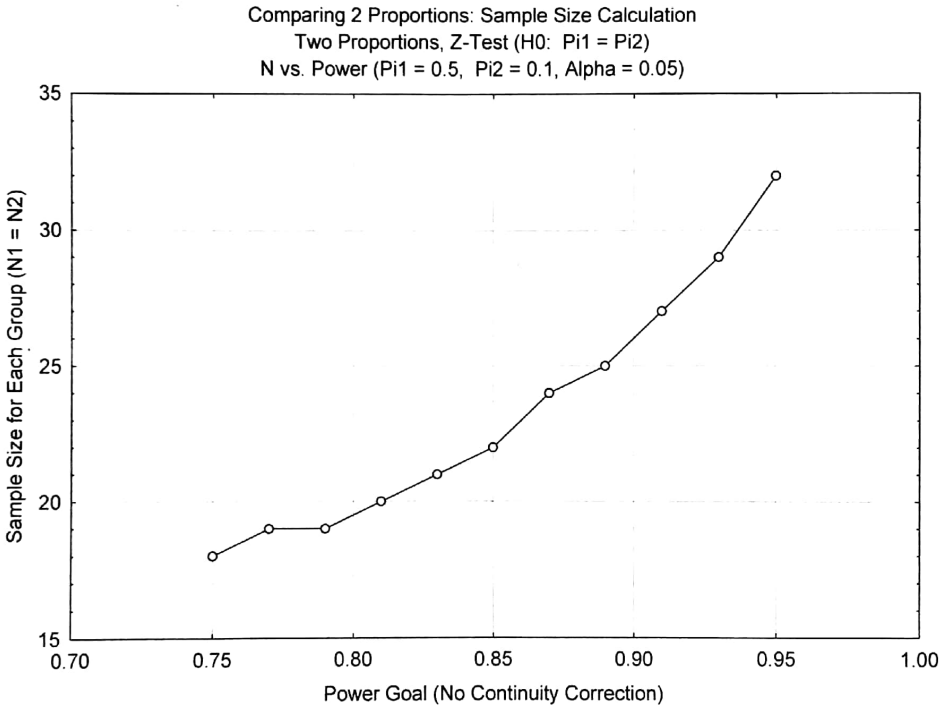
Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Başkan Yardımcısı	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E H	E H	
Dr. Öğr.Üyesi Ruhan Deniz TOPUZ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E H	E H	
Doç. Dr. Üyesi F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E H	E H	
Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Doç. Dr. Cafer Sadık ZORKUN Üye	Kardiyoloji	T.Ü.T.F. Kardiyoloji A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Galip EKUKLU Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Niyazi Cenk SAYIN Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anestezi ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anestezi ve Reanimasyon A.D.	K	E H	E H	Mazeretli
Prof. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E H	E H	Mazeretli
Avukat Emine NURLU Üye		T.Ü. Rektörlüğü	K	E H	E H	
Emekli Öğretmen Sinan SEÇKİN Üye		Serbest Üye	E	E H	E H	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Ahmet TEZEL
Dekan a.
Dekan Yrd.

Ek 2: Power Analizi

	Sample Size Calculation (two-way anova.sta Two Proportions, Z-Test H0: Pi1 = Pi2
	Value
Population Proportion Pi1	0.5000
Population Proportion Pi2	0.1000
Type I Error Rate (Alpha)	0.0500
Power Goal	0.9500
Power (Uncorrected)	0.9556
Sample Size N1	32.0000
Sample Size N2	32.0000



Ek 3: Aydınlatılmış Gönüllü Onam Formu Örneği

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz. Bu araştırmanın yürütülmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 25.02.2019 tarih ve 04/20 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Araştırmaya katılmaya karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını anlamanız çok önemlidir.

Araştırmaya katılım tamamen gönüllülük ilkesine bağlı olup katılmayı reddetmeniz herhangi bir cezaya ya da elde edilecek herhangi bir yararın kaybedilmesine kesinlikle yol açmayacaktır.

Aynı şekilde araştırmaya katılmayı kabul ettikten sonra da araştırmanın herhangi bir yerinde hiçbir neden göstermeksizin herhangi bir zarar ya da elde edilmesi beklenen bir yarar kaybına yol açmadan araştırmadan çekilebilirsiniz.

Araştırma kapsamında yapılan işlemlerin mali giderleri araştırmacılar ya da destekleyici (Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından karşılanacak olup size ya da sosyal güvenlik kurumunuza hiçbir mali yük getirmeyecektir.

Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve araştırmaya katılmak isteyip istemediğinize karar vermek için lütfen biraz düşünün.

- **Araştırmanın bilimsel adı:** Larinks Kanserlerine *SMAD4* Metilasyonu Yönünden Epigenetik Bir Yaklaşım.
- **Araştırmanın anlaşılabilir basit adı:** Larinks Kanserlerine sebep olabilecek moleküler değişikliklerin tespit edilmesi.
- **Sorumlu Araştırmacının adı ve görev yeri:** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı.
- **Araştırmanın amacı:** Bu araştırmanın amacı; hastalığınıza sebep olabilecek nedenleri ortaya çıkarmaktır. Bu sebeple bu çalışmaya dahil edilmiş buluyorsunuz. Çalışmada biyopsi materyalinizden ve yanak içi hücrelerden DNA'nız elde edilecek ve üzerinde bazı özel işlemler uygulanarak *SMAD4* adlı bir gendeki olası değişikler araştırılacaktır. Çıkacak sonuçlara göre ilerde yeni tedavi olanaklarının geliştirilmesine imkan sağlamaktır.

- **Araştırmanın niteliği (klinik, laboratuvar, epidemiyolojik, tez çalışması vb.):** Klinik-Laboratuvar.
- **Araştırmanın başlama tarihi ve öngörülen süresi:** Mart 2019 – İki yıl.
- **Araştırmaya katılması beklenen gönüllü sayısı:** 32
- **Araştırma sırasında uygulanacak olan invaziv yöntemler dahil olmak üzere gönüllüye uygulanacak yöntem, girişim ve tedavilerin tümü:** Rutin biyopsi uygulaması yanında pamuklu bir çubukla yanak içi hücre temini.
- **Araştırmanın deneysel kısımları:** Sizlerden elde edilecek bu iki örnekten DNA'larınız ayrılacaktır. Bu DNA'lar, metilasyona özel Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *SMAD4* geninin metilasyon durumu araştırılacaktır.
- **Farklı uygulama ve girişimler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı:** Yok.
- **Katılımcının araştırmaya dahil edilme nedeni:** Larinks Kanseri teşhisi konulması
- **Araştırmadan doğrudan gönüllü için beklenen yarar:** Yok.
- **Gönüllünün sorumlulukları:** Yok.
- **Gönüllünün (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacaksa ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da) maruz kalabilecekleri riskler veya rahatsızlıklar:** Gerek yoktur.
- **Risklere karşı alınan önlemler:** Yok.
- **Gönüllüye alternatif olarak uygulanabilecek olan diğer yöntemler ve bunların olası yarar ve zararları:** Yok.
- **Araştırmaya bağlı olarak bir zarar oluştuğunda verilecek tazminat ve sağlanacak tedaviler:** Yok.
- **Gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler:** Yok.
- **Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek durumlar veya nedenler:** Yok.
- **Araştırma sonunda gönüllülere bilgi verilecek mi?** Hayır.

- **Gönüllülerin araştırma hakkında, kendileri hakkında ya da araştırmayla ilgili herhangi bir beklenmedik olay hakkında daha fazla bilgi edinebilmesi için temasa geçebileceği kişi ve kendisine günün 24 saatinde erişebileceği telefon numarası:** Selahattin Alp Temiz – 05515550275
- **Gönüllülerden elde edilecek olan biyolojik materyallerin hangi amaçlarla kullanılacağı:** Epigenetik çalışmalar için.

Yukarıda açıkça tanımlanan çalışmanın ne amaçla, kimler tarafından ve nasıl gerçekleştirileceği anlayabileceğim bir ifade ile bana anlatıldı.

Bu araştırmadan elde edilen bilgilerin bana ve başka insanlara sağlayacağı yararlar bana anlatıldı.

Araştırma sırasında meydana gelebilecek riskler ve rahatsızlıklar bana anlayabileceğim bir dille anlatıldı.

Araştırma sırasında oluşabilecek zarar durumunda gerçekleştirilecek işlemler bana anlatıldı.

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ve haklarım konusunda 24 saat bilgi alabileceğim bir yetkilinin adı ve telefonu bana verildi.

Araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik ve testler ile tıbbi bakım hizmetleri için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyeceği bana anlatıldı.

Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.

Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.

Sorumlu araştırmacı / hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmediğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.

Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı / hekim ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmalim nedeniyle, benim onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabileceğini biliyorum.

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun gerekli gördüğünde, gizliliğimin korunması ilkesine uygun olarak, araştırma konusuyla ilişkili orijinal tıbbi kayıtlarıma doğrudan erişimde bulunabileceğini biliyorum.

İlgili yasal düzenlemeler gereğince kimliğimi ortaya çıkaracak kayıtların gizli tutulacağı, kamuoyuna açıklanmayacağı; araştırma sonuçlarının bilimsel toplantılarda sunulabileceği ya da yayınlanabileceği, ancak, bu tür durumlarda kimliğimin kesin olarak gizli tutulacağı bana açıklandı.

Araştırma konusuyla ilgili olarak, çalışmaya devam etme isteğimi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde bana ya da yasal temsilcime zamanında bilgilendirme yapılacağı bana açıklandı.

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu adlı metni kendi anadilimde okudum.

Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım.

Yukarıda konusu belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı.

Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nun tam imzalı bir kopyasını aldım.

- ***Gönüllünün; (El yazısı ile)***

Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için; (El yazısı ile)***

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Tarih:

Adresi (varsa telefon ve/veya faks numarası):

.....

.....

Tarih:

- ***Açıklamaları yapan araştırmacının***

Unvanı, Adı- Soyadı: (El yazısı ile)

Görev yaptığı bölüm:

İmzası:

Tarih: