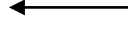


,MARAL FARZAM



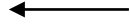
Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

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



YÜKSEK LİSANS DOKTORA
TEZİ



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

İSTANBUL-2021



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**"LARİNKS KANSERİNDE OX40, OX40L GEN
VARYANTLARININ VE SOX40L DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI"**

MARAL FARZAM

**DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN YAYLIM**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

İTHAF

*Annem ve Babam'a
ithaf ediyorum*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, çalışma süresince bilgisini ve desteğini aldığım, insani değerleri ile de bana güzel bir örnek teşkil eden, her türlü konuda desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. İlhan Yaylım'a ve anabilim dalımızda diğer tüm hocalarıma çok teşekkür ederim.

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi KBB Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yusufhan SÜOĞLU'ya, İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniğinden Doç. Dr. Ayşegül VERİM'e ve Doç. Dr. Murat Ulusan'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca büyük özveriyle yardım eden Dilara Sönmez, Ülgen Sever ve Öğretim Görevlisi Tolgahan Hakan'a teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman yardımları ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2020-36727

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 LARİNKİN ANATOMİSİ, EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ, FİZYOLOJİSİ....	4
2.1.1 LARİNKİN ANATOMİSİ.....	4
2.1.2 LARİNK EMBRİYOLOJİSİ.....	4
2.1.2.1 Supraglottik Bölge.....	5
2.1.2.2 Glottik Bölge.....	5
2.1.2.3 Subglottik Bölge.....	5
2.1.3 LARİNKİN HİSTOLOJİSİ.....	6
2.1.4 LARİNKİN FONKSİYONLARI.....	6
2.2 LARİNK KANSERİ.....	7
2.2.1 LARİNK TÜMÖRLERİ.....	7
2.2.1.1 LARİNKİN İNTRAEPİTELYAL PROLİFERATİF LEZYONLARI.....	7
2.2.1.2 LARİNKİN KARSİNOMU.....	8
2.2.1.3 LARİNK KANSERİNİN TÜMÖR YAYILIMI.....	10
2.2.2 LARİNK KANSER SEMPTOM VE BULGULARI	11
2.2.3 TANI.....	13
2.2.4 LARİNK KANSERİNDE GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ.....	13
2.2.4.1 BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ	13
2.2.4.2 “MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLEME”.....	14

2.2.4.3 PET BT.....	14
2.2.4.4 RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME	14
2.2.5 TEDAVİ.....	15
2.2.5.1 RADYOTERAPİ	15
2.2.5.2 CERRAHİ	16
2.3 İMMÜN SİSTEM.....	17
2.3.1 KONTROL NOKTALARI-MODÜLATÖR.....	18
2.3.2 OX40-OX40L EXPRESYONU.....	18
2.3.2.1 OX40'IN İFADESİ	18
2.3.2.2 OX40 LİGAND'IN İFADESİ	22
2.3.3 OX40-OX40 LİGAND ETKİLEŞİMLERİNİN FONKSİYONLARI.....	22
2.3.4 KANSER-OX40 İLİŞKİSİ	30
2.3.5 GEN POLİMORFİZMİ VE KANSERE YATKINLIK.....	30
2.3.6 SNP.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1 Örneklerin Toplanması.....	32
3.2 Kullanılan Gereçler.....	32
3.3 Kullanılan Malzemeler.....	32
3.4 Kullanılan Çözeltiler.....	32
3.5 Kullanılan Laboratuvar İşlemleri.....	33
3.5.1 DNA İzolasyonu.....	33
3.5.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	33
3.5.3 “Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi”.....	34
3.5.4 “Agaroz Jel Elektroforezi”.....	34
3.5.5 Protein Düzeyinin Elisa Yöntemi İle Tayini.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1 Demografik Veriler.....	36
4.2 Çalışılan Genlere Ait Bulgular.....	37
4.2.1 OX40 rs17568 A/G Polimorfizmine Ait Bulgular.....	37
4.2.2 OX40L rs1234313 A/G Polimorfizmine Ait Bulgular.....	40
4.2.3 İki Bölgenin Kombine Sonuçları.....	42
4.3 Larinks Kanseri OX40 ve OX40L Polimorfizmlerine Ait Haplotipleme Sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA.....	46

6. KAYNAKLAR.....	52
ETİK KURUL KARARI	67
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	69



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Larinksin Alt Anatomik Bölgeleri.....	6
Tablo 2-2: DSÖ Sınıflandırması.....	7
Tablo 2-3: Larinksin İntraepitelyal Proliferatif Lezyonları	8
Tablo 2-4: Larinks Kanserlerde TNM Evrelemesi (UICC/AJCC, 2018).....	11
Tablo 2-5: Evrelerin Gruplandırılması.....	13
Tablo 2-6: Organ Koruma Stratejileri.....	15
Tablo 2-7: İnsan Otoimmün Hastalıklarında OX40 ve OX40L Ekspresyonu	20
Tablo 3-1: Kullanılan Primerler	34
Tablo 3-2 Kullanılan Enzim ve Kesim Sıcaklığı ve Süresi	34
Tablo 4-1: Larinks Hastalarına Ait Karakteristik Özellikler.....	36
Tablo 4-2: Larinks Kanserli Hastaların Karakteristik Özelliklerine Göre ve Kontrol Grubunda OX40 rs17568 Genotip Dağılımlarının İncelenmesi.....	38
Tablo 4-3: Larinks Kanserli Hastaların Karakteristik Özelliklerine Göre ve Kontrol Grubunda OX40 rs17568 Allel Taşıma Durumlarının İncelenmesi.....	39
Tablo 4-4: Larinks Kanserli Hastaların Karakteristik Özelliklerine Göre ve Kontrol Grubunda OX40L rs1234313 Genotip Dağılımının İncelenmesi.....	40
Tablo 4-5: Larinks Kanserli Hastaların Karakteristik Özelliklerine Göre ve Kontrol Grubunda OX40L rs1234313 Allel Dağılımının İncelenmesi.....	41
Tablo 4-6: OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 Kombine Genotipleme Sonuçları.....	42
Tablo 4-7: OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 Hastalık Riskine Yönelik Kombine Genotipleme Sonuçları	43
Tablo 4-8: rs17568 ve rs1234313 Polimorfizmlerine Ait Haplotip Frekansları, Ki-kare (X ²) ve P Değerleri.....	43
Tablo 4-9: rs17568 ve rs1234313 Arası Haplotip Değerlendirmesi.....	44

Tablo 4-10: Larinks Kanseri Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde Serum sOX40 ve sOX40L Düzeyleri.....	44
Tablo 4-11: Larinks Kanseri Hastalarının Histopatolojik Verilerine Göre Serum sOX40 ve sOX40L Düzeyleri	45
Tablo 5-1: Literatürdeki Bazı Hastalıklarda Yapılan Çalışmalarda Bildirilen OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 Genotiplerine Ait Populasyon Dağılım Verileri (146) ve Bizim Verilerimizin Populasyonumuz Üzerine Dağılımı.....	49



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Larinks Anatomisi.....	4
Şekil 2-2: Baş ve Boyun Kanserlerinde Genetik	17
Şekil 2-3: OX40 ve OX40L Ekspresyonu, Etkileşimi ve Moleküler Sonuçları.....	19
Şekil 2-4: OX40 Ligasyonunun T Hücreleri Üzerindeki Etkileri.....	23
Şekil 2-5: OX40 Uyarımından Sonra Sinyal Yolu.....	24
Şekil 2-6: OX40L Ligasyonunun T Olmayan Hücreler Üzerindeki Etkileri.....	25
Şekil 2-7: OX40 Aktivasyon Mekanizmaları ve Akış Aşağı Sinyalleme Etkileri.....	28
Şekil 4-1: OX40 rs17568 Bölgesi Kesim Ürünleri.....	37
Şekil 4-2: OX40L rs1234313 Bölgesi Kesim Ürünleri.....	40

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SNPs : Tek Nükleotid Polimorfizmler	UICC/AJCC : Union For International Cancer Control/American Joint Committee on Cancer (Uluslararası Kansere Kontrol Örgütü/American Cancer Komitesi)
TNFRSF : Tümör Nekroz Faktörü Receptör Süper Ailesi	MRG : Manyetik Rezonans Görüntüleme
FAS : Fas Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü	PET-BT : Pozitron Emisyon Tomografisi-Bilgisayarlı Tomografi
DISC : Ölüm Nedeni Sinyal Kompleksi	FDG : F-18 fluoro-2-deoksi-glikoz
NFκB, PI3K, PKB : Nükleer Faktör Kappa B, Fosfatidilinositol 3-kinaz, Protein Kinaz B	NI : Lenf Nodu
sOX40L : Çözünür Homotrimerik OX40L	CO ₂ : Karbondioksit
A → G : Adenin → Guanin	SCL : Supracricoid Larenjektomi
MI : Miyokard Enfarktüsü	SGL : Supraglottik Larenjektomi
HTG : Hipertrigliseridemi	NLT : Total Larenjektomi
Apo : Apolipo Proteinleri	CTLA-4 : Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Protein 4
Cm : Santimetre	PD-1 : Programlı Ölüm-1 Reseptörü
mm : Milimetre	Tregs : Düzenleyici T Hücreleri
DSÖ : Üst Solunum Yolu Tümörleri İşbirliği Merkezi	Tconv : T Konveksiyon Isısı
EHLL : Avrupa Patoloji Derneği'nin	Tem : Tümör Mikroçevresindeki Eftör
PAH : Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar	NK : Doğal Öldürücü Hücreler
örn. : Örneğin	NKT : Doğal Öldürücü T Hücreleri
vb. : ve Benzeri	IL : İnterlökin
TNM : Tümör Nod Metastaz	mRNA : Haberci RNA

APC : Antijen Sunan Hücreler	TGF γ : Dönüştürücü Büyüme Faktör Gama
SLE : Sistemik Lupus Eritematozus	IB kinaz : Alt Birim
MS : Multipl Skleroz	IKK : IB Kinaz Kompleksi Katalitik Alt Birimi
T1DM : Tip1 Diabetes Mellitus	NIK : NF κ B İndükleyici Kinaz
IL2Ra : İnterlökin 2 Reseptör Alfa	IKK β : Nükleer Faktör Kappa β
CIA : Kolajenle İndüklenen Artrit	I κ B : İnhibitörü Kappa B
TSLP : Timik Stromal Lenfopoetin	STAT : Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Proteinlerinin Aktivatörü
IFN γ : İnterferon Gamma	PDK : PIP3 Bağımlı Kinazlar
TRAF : TNF Reseptörü ile İlişkili Faktör	BLIMP-1 : B Lenfosit Kaynaklı Olgunlaşma Proteini-1
NOD : Yumru	mAbs : Monoklonal Antikorlar
DC : Dendritik Hücre	FcR : Fc Gama Reseptörü
CXCR5 : CXC Kemokin Reseptörü	I κ B promotor : Lenfosit-Spesifik Protein Tirozin Kinaz
Tip5	IgM : İmmünoglobülin M
Th1 : T Yardımcı Hücre Tipi1	iTreg : Uyarılmış Tregler
TGF- β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta	pSmad3 : Fosfo-Smad3
Bcl-2 : B Hücreli Lenfoma 2	KO : Knockout Fareler
BCL-XL : B Hücreli Lenfoma Ekstra Büyük	GVHD : Graft-Versus-Host Hastalığı
BCL2A1 : Bcl-2 ile İlgili Protein A1	Fc : Füzyon Proteini
ERK : Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz	PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NFAT : Aktive T Hücrelerinin Nükleer Faktörü	DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
TCR : T Hücresi Reseptörü	RNA : Ribonükleik Asit

dNTP : DNA Nükleotid Bazları

mM : mili mol

bp : Birim Baz

ml : Mili Litre

μ l : Mikrolitre

g : Gram

EDTA : Etilendiamin Tetraasetik Asit

nm : Nanometre

mg/ml : Miligram/Mililitre

$^{\circ}$ C : Santigrat Derece

EtBr : Etidyum Bromür

H₂O : Saf Su

MgCl₂ : Magnezyum Klorür₂

Pmol : Pikomol

G : Guanin

A : Adenin

dk : Dakika

pg/ml : Pikogram

OR : Odds Oranı

CI : Güven Aralığı

LD : Linkage Disequilibrium/Bağlantı Dengesizliği

LOD : Limit of Detection

HDL-C : Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol

LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

ACI : Aterosklerotik Serebral Enfarktüsü

SVD : Küçük Damar Hastalığı

LAA : Büyük Arter Ateroskleroza

HTG : Hipertrigliseridemik

LDL-C : Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol

ÖZET

Tümör mikro çevresi, sürekli tümör oluşumunu, metastazı ve tümör yaşayabilitesini kolaylaştırmak için bazı moleküler süreçleri “yenileme, hızlandırma veya değiştirmeye yönelik evrimleşir”. Bu süreci yöneten mekanizmaların başında immünmodülatörler gelmektedir. İmmünomodülatörler, “T hücre yanıtını arttıran aktivatör veya azaltan inhibitör moleküller” arasındaki iletişimle gerçekleşmektedir. Son yıllarda tümöre karşı immün yanıtın geliştirilmesi için inhibitör etkinin blokasyonu gibi aktivatör etkinin arttırılmasına yönelik çalışmalar da yapılmaktadır. Bu çalışmalar literatüre değerli bilgiler katmış ancak, immün sistemin aktivasyonuna bağlı olarak, tümörün gerilemesine dair elde edilen sonuçlarda tüm kanser hastalarında ne yazık ki aynı olumlu yanıt gözlenememiştir. İmmünoterapi duyarlılığının ve bu mekanizmayı etkileyen moleküllerin ekspresyonlarının kanser türleri arasındaki farklılaşmasının yanı sıra bireyler arasında da değiştiği bildirilmiştir. Bu değişikliğin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasının ve aydınlatılmasının bu duruma bir çözüm olabileceği düşünülmektedir. Genlerin ekspresyon seviyelerini etkilediği bilinen mekanizmalardan biri olan tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNPs) immün kontrol noktaları üzerindeki etkilerinin araştırılması, güvenilir immünoterapi biyobelirteçlerin tanımlanmasında kritik öneme sahiptir.

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda “larinks kanserli hastalarda T hücrelerinin aktifleşmesi, farklılaşması, çoğalmasında” rol oynayan ve bazı immün sistem regülasyonunda etkili olduğu bilinen sitokinlerin salınımını düzenleyen OX40 (rs17568) ve OX40L (rs3850641) genleri üzerindeki bazı polimorfizmlerin araştırılmasını hedeflemekteyiz. Ayrıca ilgili SNP'lerin T hücrelerinin proliferatif tepkilerini arttırdığı bilinen çözünebilir OX40L düzeyine olan etkisi incelenecektir. Elde edilen tüm verilerin hastalığın risk ve progresyonunda önem taşıyan klinik bilgiler ile olası korelasyonlarının saptanması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Larinks Kanseri, OX40, OX40L, T Hücrelerinin Aktivasyonu, SNP

ABSTRACT

The tumor microenvironment evolves to renew, accelerate, or alter some of their molecular processes to facilitate continuous tumor formation, metastasis, and tumor viability. Immunomodulators are the leading mechanisms that govern this evolutionary process. Immunomodulators occur through communication between activator or inhibitor molecules that increase T cell response. In recent years, studies have been carried out to increase the activator effect such as blocking the inhibitory effect in order to improve the immune response against the tumor. It has been reported that the sensitivity of immunotherapy and the expression of molecules affecting this mechanism vary between cancer types as well as between individuals. It is thought that understanding and elucidating the mechanisms underlying this change may be a solution to this situation. Identifying reliable immunotherapy biomarkers is critical to investigating the effects of single nucleotide polymorphisms (SNPs), one of the mechanisms known to affect the expression levels of genes, on immune control points.

In the light of all this information, we aim to investigate some polymorphisms on the OX40 (rs17568) and OX40L (rs3850641) genes, which affect the activation, differentiation, proliferation of T cells and the release of cytokines known to be involved in some immune regulation in patients with laryngeal cancer. In addition, its effect on soluble OX40L level, which is known to increase proliferative responses of T cells, will be examined. It was aimed to determine possible correlations of all data obtained with clinical information that is important in the risk and progression of the disease.

Keywords: Larynx Cancer, OX40, OX40L, Activation of T Cells, SNP

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Baş boyun bölgesinde en sık görülen kanserlerden biri olan larinks kanseri, 50-70 yaş arası erişkinlerde tüm kanserlerin %2'sini oluşturur. Daha genç yaşlarda görülme sıklığı ise %1 olarak bildirilmiştir (1,3). Türkiye'de erkeklerde görülen kanserler arasında 2.Sırada yer aldığı ve erkeklerde kanser nedenli ölümlerin %7'sinden sorumlu olduğu belirtilmektedir. Sigara ve alkol bağımlılığı oral kavite, orofarinks, hipofarinkste olduğu gibi larinks de “etkileyen başlıca risk faktörleri” olduğu gösterilmiştir. Larinks kanserinin belirtileri larinksin tutulan alt bölgesine göre değişmekle beraber, genel olarak boğaz ağrısı, disfaji, odinofaji ve ses kısıklığı ile seyretmektedir (4,7). Diğer kanser tipleri arasında larinks kanseri uygun tanı ve yeterli tedavi sağlandığında tedaviye en iyi yanıt veren kanserlerdendir. Ancak hastalığın evresinin ileri olması durumunda kemoterapi, radyasyon terapisi ve cerrahiden kaynaklanan akut ve uzun vadeli komplikasyonlar görülebilmektedir ve bu hastaların tedavisi multidisipliner yaklaşımları gerekli kılmaktadır (6,7).

Son yıllarda teknolojinin ilerlemesi ile yapılan çalışmalarda kanserde görülen moleküler süreçlerin sadece kanserin kendisinden değil aynı zamanda çevre doku ve hücrelerden de etkilendiğini göstermiştir (8). Bu nedenle tedavi yaklaşımları kanserin başlamasını ve ilerlemesini etkileyen bu mikroçevre etmenlerini hedef almaya yönelmiştir. Kanser hücrelerini çevreleyen alana ait etmenlerin sürekli değişimi “tümör oluşumunu, metastazı ve kanser tedavisine” karşı direncini de etkilemektedir. Bu etkileşim çoğu zaman kanserin lehine gelişerek “kanser hücrelerinin immün sistemden kaçmasına, ilaçlara olan direncine ve gelişimine” katkı sağlamaktadır. Bu nedenle kanser sürecini yöneten tüm mekanizmaların moleküler süreçleri önemlidir (9). İmmün sistemin antitümöral etkisinde kritik rol oynayan mekanizmalardan immün kontrol noktaları, normalde inflamasyon mekanizmasının regülasyonunu sağlamaktadır (10). İmmün sistemi kontrol eden en geniş reseptör ailelerinden biri de "Tümör Nekroz Faktörü Receptör Süper Ailesi" (TNFRSF) 27 farklı ligand içerir ve immün yanıtın oluşumunun farklı aşamalarında eş-uyarıcı sinyal olarak fonksiyon gösterebilirler. Bu uyarılardan FasL ve TRAIL apoptotik ölümü uyararak ölüm nedenli sinyal kompleksinin (DISC) oluşmasına neden olurken, TNFRSF'nin bir başka grubu (CD70/27, 4-1BBL/4-1BB, CD40L/CD40 ve OX40L/OX40 gibi TNFL/TNFR çiftleri)

reseptör ligand ilişkisi ile NFκB, PI3K ve PKB sinyal yollarını tetikleyerek T hücre aktivasyonunu gerçekleştirirler **(11)**. T hücrelerinin aktifleştirilmesinde OX40L/OX40 bu moleküllerin başında gelir ve T hücrelerinin hayatta kalmasını ve sitokin salınımını arttırdığı tespit edilmiştir. Rekombinant çözünür OX40L (sOX40L), trimerik olarak bulunur ve bu şekilde OX40'la bağlanmasına rağmen pratik olarak inaktiftir. Ancak, çözünür OX40L trimerlerinin aktivitesini güçlü bir şekilde arttırmak amacıyla, çözünür OX40L antikörlerle çapraz bağlanır veya bir heksamerik füzyon proteini olarak ekspresyonla oligomerizasyonu gerçekleştir **(12,13)**.

OX40L/OX40 üzerine yapılan çalışmalar sonrasında, kolon kanseri tanısı alan hastalara anti OX40 tedavisi sonrası T hücresi miktarında ve immün tepkinin oluşmasında artış olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, bazı kolon kanseri hastalarında tümörün küçülmesine rağmen, objektif klinik bir yanıt gözlemlenememiştir **(12)**.

Belirli bir toplumda hastalığa gösterilen semptomların ve tedaviye yanıtın kişiler arasındaki farklılaşması genomda meydana gelen değişiklikler sonucu oluşan polimorfizmlerden kaynaklanabilmektedir. “Polimorfizmler, genetik belirteç olarak da kullanılabilen”, bireylerin ilaçlara verdikleri tepkilerin yanı sıra hastalığın gelişimini, ilaçların bireyde gösterdiği yan etkilerinin de diğer bireylere nazaran farklılık göstermesine sebep olabilirler **(14)**. İran popülasyonu ile yapılan bir çalışmada OX40L geninin rs3850641 (A → G) polimorfizminin meme kanseri ile ilişkisi araştırılmış ve kanserin duyarlılığı ile anlamlı bir korelasyona sahip olduğunu tespit etmişlerdir **(15)**. “Aynı Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP)” ile yapılan bir başka çalışma ise miyokard enfarktüsü riski (MI) ile ilişkiyi araştırmak amacıyla Çin Han popülasyonundan 454 hasta ve 512 kontrol ile gerçekleştirilmiş ve rs3850641 polimorfizminin “miyokard enfarktüsü (MI) riskini arttırdığı” doğrulanmıştır **(16)**. Çin popülasyonunda OX40L (rs3850641) ve OX40 (rs17568) gen varyantlarının endojen hipertrigliseridemi (HTG) hastalarında serum lipitleri ve apolipo proteinleri (apo) düzeyleri ile ilişkileri araştırılmış ve sonuç olarak bazı lipit ve lipoprotein varyasyonları ile “korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir” **(17)**.

Biz bu çalışmamızda literatürde ilk kez larinks kanserinde, hasta ve sağlıklı bireylerden alınan serumlarda çözünebilir OX40L ile tek nükleotit mutasyonu (OX40; rs17568 OX40L, rs3850641) arasındaki ilişkileri incelemeyi hedefledik. Çalışmamız

sonucunda elde edilen veriler aynı zamanda hastaların histopatolojik verileri ile değerlendirilecek olduğundan “hastalığın tanı, tedavi ve gelişimi” için de önemli bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

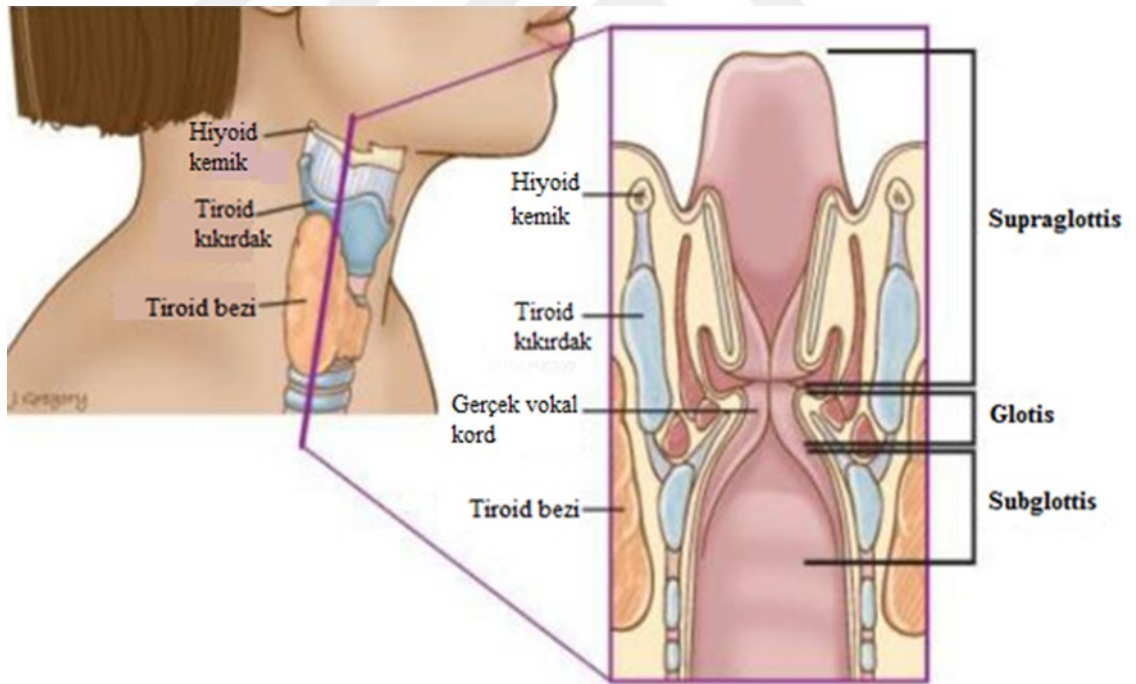


2. GENEL BİLGİLER

2.1 LARİNKSİN ANATOMİSİ, EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ, FİZYOLOJİSİ

2.1.1 LARİNKSİN ANATOMİSİ

"Larinks, glottis, supraglottis ve subglottis adı verilen üç farklı bölgeye ayrılır". Bu üç bölgede nörovasküler, kıkırdak yapılar ve kas sistemi, larinksin bir birim olarak çalışmasına ve birçok işlevi yerine getirmesini sağlamak için iç içe geçmiştir. Larinksin temel işlevi solunum ve yutma sırasında ses çıkarmak ve solunum yollarını korumaktır (Şekil 2-1). Larinksin kas yapısı ekstrensek ve intrensek olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılır. Ekstrensek kaslar larinksi yükseltip alçatarak yutma fonksiyonuna yardımcı olur. İntrensek kaslar ise vokal kordları açıp kapatarak fonksiyon, solunum yolunun açılıp kapanmasını sağlarlar (18).



Şekil 2-1: Larinks Anatomisi (19)

2.1.2 LARİNKS EMBRİYOLOJİSİ

Bocca ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırma, larinksin farklı embriyolojik kökenleri, "üst" ve "alt" olarak farklı lenfatik dolaşımı olan iki bağımsız hemilarenksten

oluşturduğunu göstermiştir. Her bir hemilarenks kanserinde kanserler birbirinden bağımsız olarak gelişir ve kanserin hemilarenksler arasında yayılması bu embriyolojik sınırlara bağlıdır (20). Larinks, hem endoderm hem de mezodermden “intrauterin gelişimin dördüncü haftasında” oluşur. Larinksin mukozası endodermden kaynaklanırken, kıkırdaklar ve kaslar üçüncü, dördüncü ve altıncı faringeal arklardan gelişir. Dördüncü haftada, gelişmekte olan ön bağırsakta laringotrakeal oluk olarak bilinen bir büyüme ortaya çıkar. Bu oluk derinleşir ve sonunda özofagotrakeal septumu oluşturur, yemek borusunun septumun dorsal tarafında ve solunum yolunun geri kalanının öne doğru uzanmasına izin verir. Oluğun uzunluğu, sonunda larinks, trakea ve akciğerlere yol açacak olan laringotrakeal divertikül olmaya devam eder. Epitelyal proliferasyon nedeniyle laringeal lümen ilk başta silinir. Ancak 7-10.Haftalar arasında yeniden kanalize olur. Faringeal arklar da gırtlakta sinirlerin, kıkırdakları ve kasların oluşumunu gerçekleştirir. Embriyonik gelişim, fonksiyon ve lenfatik damar yapısı göz önüne alındığında, gırtlak üç alana ayrılır (18,21).

2.1.2.1 Supraglottik bölge

Epiglotisin tepesinden ventrikül tabanına kadar uzanır. Epiglottik larengeal yüzeyi epiglottik katlantılar, aritenoid kıkırdağın larengeal yüzey, yalancı vokal kordlar ve ventrikülleri içerir. Her iki tarafta zengin bir lenfatik ağ vardır. Glottik bölge ile arasındaki anatomik gerçek sınır, ses tellerinin skuamöz epitelyumu ve ventrikülün tabanıdır (21).

2.1.2.2 Glottik bölge

Ventrikülün tabanı ile vokal kordların 1cm altındaki yatay düzlem arasındaki alandır. İki gerçek vokal kord, ve krikoaritenoid eklemleri içerir. Lenfatiklerden fakir bir bölgedir (21).

2.1.2.3 Subglottik bölge

Glottik ve subglottik alan arasındaki sınır, ses tellerinin serbest kenarın arkada 5mm önde ise 1cm altındadır. Subglottik alanının alt sınırı da krikoid kıkırdağın alt kenarıdır (Tablo 2-1) (21).

Tablo 2-1 Larinksin Alt Anatomik Bölgeleri (22)

Bölge	Uzanımı	İçeriği
Supraglottik	Epiglotun tepesinden laringeal ventrikülün tabanına kadar	Epiglot Ventriküler bant (yalancı kord) Aritenoid katlantılar Aritenoid kıkırdaklar Preepiglottik boşluk Paraglottik boşluk Vestibül□
Glottik	Laringeal ventrikülün tabanından başlar vokal kordların 1cm aşağısına kadar iner	Gerçek vokal kordlar Anterior komissür Posterior komissür
Subglottik	Gerçek kordların 1cm altından başlar krikoid kıkırdak alt kenarına kadar uzanır	

2.1.3 LARİNKİN HİSTOLOJİSİ

Skuamöz hücreli karsinom, laringeal malignitenin en yaygın histolojik türüdür. Çoğu çalışmada larinks kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. 1993'de "DSÖ Üst Solunum Yolu Tümörleri İşbirliği Merkezi", laringeal malignitelerin histolojik sınıflandırmasını revize etmiştir. Larinks kanserinde tümörün diferansiyasyon derecesi önem taşımaktadır. Kötü diferansiye tümörler, iyi diferansiye olanlara göre daha sık ve genellikle lenfatikler yoluyla metastaz yapar (23,25).

2.1.4 LARİNKİN FONKSİYONLARI

a) Hava Yolunun Korunması: Larinks, yutma sırasında hava dışındaki maddelerin akciğerlere kaçmasını önlemek için sfinkter görevi görür.

b) Solunum: Gaz değişimine ve asit-baz dengesine yardımcı olur.

c) Ses oluşumu

d) Göğüs kafesinin fiksasyonu

e) Deglutisyon (Yutmaya yardımcı rolü)

f) Ekspektorasyon (Öksürük)

g) Sirkülasyon (Dolaşıma yardımcı rolü)

h) Emosyon: Kişinin zihinsel durumuna göre, boğazdaki ses değişir (26).

2.2 LARİNK KANSERİ

Her yıl dünya çapında yarım milyondan fazla hasta “baş ve boyun yassı hücreli karsinom” tanısı almaktadır. Sigara ve alkol tüketimi, özellikle orofarinks, ağız boşluğu, hipofarenks ve larinks etkileyen bu “hastalık için ana risk faktörleridir”. Semptomlar tümörün konumuna bağlı olarak değişmekle birlikte boğaz ağrısı, yutma güçlüğü ve ses kısıklığını içerebilir. Hastalarda, genellikle muayene esnasında tanımlanabilecek belirgin boyun kitlesini bulurlar. Tedavide kemoterapi, radyasyon tedavisi ve cerrahi tedavi göz önüne alınarak multidisipliner yaklaşım planlanmalıdır. Bu anlamda, doğru klinik değerlendirme, hastalık evrelemesi ve doğru tedavi planı çok önemlidir (27).

“Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu” fenotip, klinik, patolojik ve biyolojik heterojenlik özelliklerine sahip karmaşık bir hastalıktır. Bu kanserin ortaya çıkmasının ve gelişmesinin “skuamöz epitel hücrelerindeki” ve moleküler yollardaki kademeli değişikliklerden kaynaklandığına inanılmaktadır (Tablo 2-2). Larinks kanserlerinin çoğu glottik yerleşimli kanserler olup supraglottik kanserler en sık gözlenen ikinci tiptir (28,30).

2.2.1 LARİNK TÜMÖRLERİ

Tablo 2-2 DSÖ Sınıflandırması (31)

1) Malign epitelyal tümörler	2) Nöroendokrin tümörler
a) Skuamöz hücreli karsinoma	3) Benign epitelyal tümörler
- Verrüköz karsinom	-Papillom
- Bazaloid yassı hücreli karsinom	-Papillomatozis
- Papiller yassı hücreli karsinom	-Tükrük bezi tipi adenomlar
- Spindle cell karsinom	4) Yumuşak doku tümörleri
- Akantolitik yassı hücreli karsinom	5) Hematolenfoid tümörler
- Adenoskuamöz karsinom	6) Kemik ve kıkırdak tümörleri
b) Lenfoepitelyal karsinom	7) Mukozal malign melanom
c) Dev hücreli karsinom	8) Sekonder tümörler
d) Malign tükrük bezi tipi tümörler	

2.2.1.1 LARİNKİN İNTRAEPİTELYAL PROLİFERATİF LEZYONLARI

DSÖ'ye göre sınıflandırılan intraepitelyal lezyonlar:

"Ljubljana sınıflandırması, DSÖ sınıflandırmasıyla" tam olarak aynı değildir (Tablo 2-3) (32).

Tablo 2-3: Larinksin İntraepitelyal Proliferatif Lezyonları (32)

Larinks kanserlerinin DSÖ ye göre sınıflandırılması	LJUBLJANA Benzeri olan
İntraepitelyal Proliferatif lezyonları	
1. Basit skuamöz hücre hiperplazisi hiperplazi (iyi huylu)	Basit hiperplazi, anormal
2. Birinci derece displazi Prekanseröz (düşük risk)	atipik hiperplazi
3. İkincil displazi prekanseröz (düşük risk)	atipik hiperplazi
4. Üçüncü derece displazi prekanseröz (yüksek risk)	karsinoma insitu
5. Karsinoma in situ prekanseröz (yüksek risk)	karsinoma insitu

Displazi (karsinoma in situ): İnvazyon dışında kanserin tüm özelliklerini (“tabakalaşma kaybı, şiddetli atipi, çoklu mitoz”) taşıyan epitel hücresidir. Epitelin her katmanında mitozlar 5'ten fazladır. Anormal mitoz yaygındır. Hücrelerde Hipokeratoz bulunabilir (20). "Avrupa Patoloji Derneği'nin, EHLL" çalışma grubu bu sınıflandırmayı 1999'da yeniden düzenlenmiştir. “Basit ve iyi huylu anormal hiperplazi”, “atipik hiperplazi prekanseröz evre (epitelde dejenerasyon)”, “karsinoma in situ zorunlu prekanseröz lezyonlar” olarak kabul edilir. Malign dönüşüm oranı; Basit hiperplazi ve displazide %0,9, Atipik hiperplazide %11'i olarak rapor edilmiştir (33).

2.2.1.2 LARİNKSİN KARSİNOMU

Larinks Kanseri Epidemiyolojisi

Sistemik kötü huylu tümörlerin %2-5'i ve “baş ve boyun kötü huylu tümörlerin” %25'inden sorumludur. Larinks kanserin başlangıç yaşı 60 ila 65 arasında %45 oranındadır. Son yıllarda kadın prevalansındaki artış, iş hayatında erkekler kadar toksik maddelere maruz kalan kadınlar ve kadınlar arasında sigara kullanımının artmasına bağlanmıştır (34).

Supraglottik kanserler, larinks kanserlerinin yaklaşık üçte birini, subglottik kanserler, larinks kanserlerinin <%2'sini, glottik kanserler de tüm larinks kanserlerinin yaklaşık üçte ikisini temsil eder. Türkiye'de larinks kanserinin durumuna ilişkin yeterli veri yoktur. Elçi ve arkadaşlarının çalışmalarında, Türk popülasyonunda gırtlak kanseri

erkek kanser hastaları arasında ikinci sıklıkta yer almakta olduğu ve tüm ölümlerin %7'sini oluşturduğu bildirilmektedir (35,36).

Larinks Kanseri Risk Faktörleri

Larinks kanseri olan hastaların %95'inin sigara öyküsü vardır. Hastalık etyolojisinde sigara ve alkol larinksin yanı sıra orofarenksi, ağız boşluğunu ve hipofarinks etkileyen önemli bir risk faktörü olarak gösterilmiştir. Tütün ve alkolün birlikte kullanımının çok sinerjetik bir etkiye sahip olduğu da ayrıca gösterilmiştir (30,37,38).

Baş ve boyun kanseri olan hastalar arasında, sigarayı bıraktıktan sonra ikincil veya eşzamanlı kanser sıklığı, sigarayı bırakmayan hastalardan farklı değildir. Araştırmaya göre, hücrelerdeki birikim ve sürekli hasarın varlığı kritik bir seviyeye ulaştıktan sonra, sigarayı bırakmanın önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (39).

Çalışmalar, tütün kullanımı ile ilişkilendirilen kanser vakalarına neden olduğu düşünülen maddenin nikotin değil, "polisiklik aromatik hidrokarbonlar, PAH", içeren katran olduğunu göstermiştir. Bir başka önemli neden, tütün ile sinerjetik bir etkiye sahip olduğu gösterilen alkoldür. Alkolün glottik lezyonlardan ziyade supraglottik tümörler üzerinde kanserojen etkisi vardır. Diğer risk faktörleri arasında, insan "papilloma virüsü" "Epstein-Barr virüsü", Radyasyon, Bloom sendromuyla ilişkili virüsler bulunmaktadır (40,42).

"Yetersiz ve yanlış beslenmenin" görüldüğü kişilerde "larinks kanseri görülme sıklığının" artacağı ileri sürülmüştür (43).

"Mesleki ve çevresel faktörler" larinks kanserin gelişiminde rol oynayabilir. "Polisiklik aromatik bileşiklere", çimento ve metal tozuna, asbest ve vernik ile temas etmek larinks kanseri gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir (44).

Çalışmalar, basit herpes enfeksiyonu ile lökoplaki ve kanser arasında bir ilişki olabileceğini göstermiştir. İnsan papilloma virüsü enfeksiyonunun larinks kanserindeki rolü belirsizdir (45).

İyonize radyasyonun larinks kanseri için risk faktörü olduğu öne sürülmüştür. Raporlara göre, solunum papillomuna bağlı larinks kanseri gelişen hastaların çoğu radyoterapi görmüştür. Larinks kanserinde bazı kişiler radyoterapiden yıllar sonra

gelişen tümörün tekrarlayan bir tümör olmadığını, radyasyona bağlı olarak oluşan ikinci bir primer tümör olduğunu düşünmektedir (46,47).

Histopatoloji

Tüm laringeal malignitelerin %95-98'i "yassı epitel hücreli karsinomdur". Farklılaşma derecesi farklı olmasına rağmen, glottik kanser daha iyi ayırt edilir. Bununla birlikte, larinksin hücre tipine bağlı olarak, diğer patolojiler düşük bir oranda görülebilir. Bunlar epitelyal kökenli (verruköz skuamöz hücreler, bazal benzeri skuamöz hücreler), nöroendokrin kökenli (karsinoid, küçük hücreli kanser), müsinöz bez kökenli (adenoid kistik kanser, adenokarsinom, mukoepidermoid kanser), melanosit kökenli, mezenkimal kökenli (fibrosarkom) ve lenfoid retikulum kaynaklı tümörler (lenfoma, plazmositoma) "daha düşük insidansa sahiptir" (30).

2.2.1.3 LARİNKS KANSERİNİN TÜMÖR YAYILIMI

Larinks kanseri doğrudan infiltrasyon, lenfatik, hemorajik ve periferik sinir yollarından yayılır. Perinöral İnvazyon kötü bir prognoz olup sinir boyunca yayılır. Larinks kanseri, bulunduğu yere göre supraglottik, glottik, subglottik ve transglottik olmak üzere dört gruba ayrılır. Glottik kanserin supraglottik kansere oranı yaklaşık 3:1'dir (30,48).

Supraglottik

Bütün vakaların %30-35'ini oluşturmaktadır. Supraglottik kanserler tespit edildiğinde, genellikle daha büyüktür. Supraglottisin ön bölümünden (epiglot), supraglottis kenarından (epiglottik kıvrımlar) ve ventriküllerden gelişimlerine göre supraglottik tümörler üç kategoriye ayrılabilir (49,50).

Glottik

Glottik tümörlü kanserler, larinks kanseri vakalarının %60-65'ini oluşturlar ve bu tip kanserli hastaların, ses kısıklığı nedeniyle sağlık kuruluşlarına daha erken başvuru yaptıkları bilinmektedir. Kıkırdak duvarlarının ve çevresindeki lenfatik yapı eksikliği nedeniyle uzun vadeli lokalize kalırlar (49). Erken (T1-T2) tümörlerde servikal lenf nodu metastazı nadirdir. Bu nedenle profilaktik lenf nodu diseksiyonuna gerek yoktur. T2-T3 tümörlerinin lenf nodu tutulum oranı %8-30'dur. Glottik kanser nadiren tiroid kıkırdağını işgal eder, ön laringeal apselere neden olur ve enfekte lingual tiroid kisti ile karıştırılabilir (50).

Subglottik

Birincil subglottik kanser, bütün larinks kanserlerinin yalnızca %4'ünü oluşturur. Subglottik tümörün primer bölgesini belirlemek zordur. Tanı anında subglottik tümörlerin yarısında krikoid kıkırdak invazyonu mevcuttur. Subglottik alandaki kanserin cerrahi tedavisi total larenjektomidir (30).

Transglottik

Transglottik kanser; gırtlığın bir bölgesinden diğerine glottis yoluyla yayılan tümörlere denir. Paraglottik alana erken yayılım nedeniyle prognoz kötüdür (21). Supraglottik veya subglottik bölgeyi etkileyen ve ventrikülden geçen kanser erken yayıldıkları için prognoz kötüdür (48).

Lenfatik Yayılım

Larinks kanserinde boyun metastazı en önemli prognostik faktördür. Supraglottik kanser geç saptanabilir ve gizli metastazlara neden olabilir. Her seride bu bölgedeki servikal metastaz oranı T1 lezyonlarında %6-25, T2 lezyonlarında %30-70 ve T3 ve T4 lezyonlarında %65-80'dir. Evre T'ye göre, gizli metastaz oranı %20 ile %50 arasında değişir (Tablo 2-4). En yaygın lenf nodu grupları ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplardır (Tablo 2-5). Glottik kanserin servikal metastazlara neden olma olasılığı düşüktür. T1 evre kanserin metastaz olasılığı %5'ten az, T2 evre kanserin %5-10, T3 evre kanserin %10-20, T4 evre kanserin %25-40'tır. Subglottik tümörlerin boyun metastazı oranı yaklaşık %20'dir (30).

2.2.2 LARİNKS KANSER SEMPTOM VE BULGULARI

Larinks kanseri, etkilendiği bölgeye bağlı olarak değişmekle birlikte, genellikle boğaz ağrısı, yutma güçlüğü, ağrı (örn. Çiğneme sırasında, yutma sırasında, kulak ağrısı, vb.), ses kısıklığı semptomları ile kendini gösterebilir ayrıca kanama, yaraların geç iyileşmesi, konuşma bozuklukları, disfaji ve nefes darlığı da görülebilir malign tümörlerin boyundaki lenf düğümlerine metastaz yapma eğilimi nedeniyle, boyunda bir kitle varlığı da görülebilmektedir (6,7,51,52).

Tablo 2-4 Larinks Kanserlerde TNM Evrelemesi (UICC/AJCC, 2018) (53)

Primer tümör (T)	TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
	T0	Primer tümör bulunamıyor
	Tis	Karsinoma in situ

Supraglottik	
T1	Tümör bir tarafta supraglottisin bir bölgesinde sınırlı
T2	Tümör vokal kord fiksasyonu olmaksızın supraglottisin birden fazla bölgesini, glottisi veya subglottis dışındaki yerleri (vallekula, dil kökü, piriform sinüsün medial duvarını) tutmuş
T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı ve/veya postkrikoid alan, preepiglottik doku, derin dil kökü invazyonundan biri mevcut
T4a	Tümör tiroid kartilaja invaze ve/veya boynun larinks dışı yumuşak dokulara yayılmış
T4b	Tümör prevertebral boşluğa veya mediastene invaze olmuş veya karotisi tutmuş
Glottik	
T1	Tümör vokal kordlara sınırlı (anterior veya posterior komissür tutulmuş olabilir), vokal kord hareketleri normal
T2	Tümör supraglottise ve/veya subglottise uzanmış, vokal kord hareketleri sınırlı
T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı
T4a	Tümör tiroid kartilajı tutmuş ve/veya boyundaki larinks dışı yumuşak dokulara yayılmış
T4b	Tümör prevertebral boşluğa veya mediastene invaze olmuş veya karotisi tutmuş
Subglottis	
T1	Tümör subglottise sınırlı
T2	Tümör vokal korda yayılmış, vokal kord hareketleri normal veya sınırlı
T3	Tümör vokal kord fiksasyonu ile birlikte larinkse sınırlı
T4a	Tümör tiroid kartilajı tutmuş ve/veya boyundaki larinks dışı yumuşak dokulara yayılmış
T4b	Tümör prevertebral boşluğa veya mediastene invaze olmuş veya karotisi tutmuş
Bölgesel lenf nodu (N)	NX Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor
	N0 Bölgesel lenf nodu metastazı yok
	N1 En büyük boyutu 3cm' yi geçmeyen, tek ipsilateral lenf noduna metastaz
	N2a En büyük boyutu 3 ile 6cm arasında, tek ipsilateral lenf noduna metastaz
	N2b En büyük boyutu 6cm' yi geçmeyen, birden çok ipsilateral lenf nodu metastazı
	N2c En büyük boyutu 6cm' yi geçmeyen, bilateral veya kontralateral lenf nodu metastazları
	N3 En büyük boyutu 6cm' yi geçen lenf nodu metastazı
	MX Uzak metastaz değerlendirilemiyor
	M0 Uzak metastaz yok
	M1 Uzak metastaz mevcut

Tablo 2-5 Evrelerin Gruplandırılması (40)

Evre 0	Tis	N0	M0□	
Evre I	T1	N0	M0	Erken Evre
Evre II	T2	N0	M0	
Evre III	T3	N0	M0	
	T1-3	N1	M0	
Evre IVa	T4a	N0-1	M0	İleri Evre
	T1-4a	N2	M0	
Evre IVb	T4b	Herhangi bir N	M0	
	Herhangi bir T	N3	M0	
Evre IVc	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	

2.2.3 TANI

Diğer kanser türleri arasında larinks kanseri, uygun tanı ve tedavisi sağlandıktan sonra “tedaviye en iyi yanıt veren tümördür”. Endoskopi ve biyopsi yüzeysel tümörlerin kesin tanısını koyabilmekle birlikte, görüntüleme genellikle derin doku istila, kıkırdak istilası, submukozal yayılıma, subglottik uzantı ve lenf düğümü metastazı gerektirir. Bununla birlikte, larinks kanserli hastalarda kemoterapi, radyoterapi ve cerrahinin tedavinin yanı sıra akut ve uzun süreli komplikasyonlar nedeniyle, hastaların tedavisinde multidisipliner yaklaşımların benimsenmesi önemlidir (6,7,54).

2.2.4 LARİNK KANSERİNDE GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

Larinks kanseri şüphesi olan hastalarda endoskopi, tümör mukozal yayılımını ve kord hareketini en iyi şekilde değerlendirebilir. Radyografi, evreleme, tedavi planlaması ve tedavi sonrası takip ise hastalıkta önemli bir rol oynar. Görüntüleme yöntemi, tümör evreleme doğruluğunu artırabilir ve tedavi seçeneklerini etkileyebilir (8,55).

2.2.4.1 BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ

Bilgisayarlı tomografi, larinks kanserinin değerlendirilmesinde tercih edilen görüntüleme yöntemidir. Bilgisayarlı tomografi yeterli bilgiyi sağlamıyorsa manyetik rezonans görüntüleme yöntemi olarak kullanılabilir (56).

Bilgisayarlı tomografinin avantajları;

- 1) Yaygın olarak bulunması
- 2) Manyetik Rezonans Görüntüleme, (MRG)'den daha ucuz olması
- 3) Kısa inceleme süresi
- 4) Kemik yapısının daha net değerlendirilmesi
- 5) Özellikle lenf düğümü tutulumunu göstermede güvenilir olması
- 6) Yüksek kaliteli

multiplanar ve üç boyutlu görüntü elde edilebilmesi 7) MRG ile karşılaştırıldığında daha az artefakt oluşturmaktadır (57).

Bilgisayarlı tomografinin dezavantajları;

1) MRG ile karşılaştırıldığında düşük yumuşak doku çözünürlüğü ve duyarlılığın düşük olması 2) Radyasyona maruz kalmadır (57).

2.2.4.2 “MANYETİK REZONANS GÖRÜNTÜLEME”

"Manyetik rezonans (MR), bilgisayarlı tomografi (BT)" gibi bir görüntüleme yöntemidir (58). Bazı merkezlerde tanı için ilk seçenek olarak manyetik rezonans görüntüleme tercih edilmektedir. Tedavi planını etkileyen kıkırdak invazyonu belirlemenin zor olduğu durumlarda manyetik rezonans görüntüleme kullanılır (59).

2.2.4.3 PET BT

PET/BT Uygulamaları

Günümüzde PET görüntüleme esas olarak onkoloji, kardiyoloji ve nörolojide kullanılmaktadır. "FDG-PET/BT endikasyonları" şunları içerir; ama bunlarla sınırlı değildir.

1. Malign/benign lezyonları ayırt etmesi 2. Metastatik lezyonlar veya paraneoplastik sendromlar tespit edildiğinde, primer tümörün yeri belirlenmesi 3. Bilinen malignitelerin evrelendirilmesi 4. Malign tümör tedavisinin etkinliğini izlemesi 5. Tedavinin uygulanmasından sonra fiziki muayene veya diğer görüntüleme yöntemi ile saptanan lezyonun tümör, fibrozis veya nekroz olup olmadığının belirlenmesi 6. Özellikle tümör belirteçlerinin seviyesi yükselmişse, tümör rekürrensini tespit edilmesi 7. Biyopside en iyi bilgiyi sağlayacak tümör alanının seçilmesi 8. Radyoterapi planının yönlendirilmesi 9. Ateroskleroz ve enfeksiyonun değerlendirmesi gibi onkolojik olmayan uygulamalar (60).

2.2.4.4 RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Radyolojik değerlendirmenin yapılabilmesi için anatomik yapının iyi anlaşılması önemlidir. Tedavi yöntemini etkileyeceğinden, supraglottik, glottik ve subglottik alan ile bunları oluşturan yapı ve bitişik yumuşak doku arasındaki farkın iyi tanınması gerekmektedir. Laringeal tümörler mukozanın altına yayılabilir ve çevre anatomik

yapılara yayılabilir, bu durumda endoskopi yetersiz kalabilmektedir ve radyolojik değerlendirme giderek önem kazanmaktadır (61).

2.2.5 TEDAVİ

Kanser tedavilerinde en iyi yaklaşım stratejisi, her hastayı ayrı ayrı değerlendirerek “hastaya özel tedavi yaklaşımlarıdır”. İlk olarak, hasta için organ koruma stratejisi belirlenir (Tablo 2-6) (62).

Tablo 2-6 Organ Koruma Stratejileri (62)

Organ Koruma Stratejileri			
Cerrahi		Cerrahi Olmayan	
Açık/Ekternal		Endoskopik	Radyoterapi Kemoterapi
-Supraglottik Larinjektomi -Vertikal Parsiyel Larinjektomi -Suprakrikoid Parsiyel Larinjektomi		-Transoral Lazer Mikrocerrahi	
		-Transoral Robotik Mikrocerrahi	
		-Powered/Mikrodebridman Eksizyon	
		-Coblation Eksizyon	

Larinks kanseri tedavisinde, şu anda iki ana tedavi yöntemi vardır: cerrahi ve radyasyon tedavisi. Radyoterapi ana tedavi olarak seçilir ve başarısız olursa, cerrahi salvage tedavisi olarak kullanılır (48).

Erken kanser tedavisi tümöre ve hastanın tercih seçeneklerine göre yapılır. Supraglottik “larinks kanserinin erken evrelerinde” (evre I ve II) cerrahi tedavi, glottik kanserde radyoterapi veya konservatif cerrahi, subglottik kanserde ise cerrahi tedavi uygulanır. Erken evre larinks kanserlerinde primer tedavi radyoterapi veya cerrahi olsun başarı oranları benzerdir. Evre I kanserde %90 dan fazla, evre II de ise %80-85 oranındadır. Tanı sürecinde, başlangıçtan itibaren (evre III ve evre IV) tümörleri olan hastalar için ileri tedavi yöntemlerinin kullanılması, ilk önce cerrahi tedaviye tabi tutulması ve daha sonra ameliyat sırasında çıkarılan materyallerin ameliyat sonrası kontrol edilmesi sonucu ameliyat sonrası radyoterapi uygulanır (51).

2.2.5.1 RADYOTERAPİ

Erken evre glottik tümörler (evre I ve evre II) için tercih edilen tedavidir. Radyoterapi alan hastaların ses kalitesi, ameliyat olan hastalara göre daha iyidir. Larinksin tutulan bölgelerine göre değerlendirildiğinde supraglottik kanserlerde cerrahi tedavi ile sağkalım oranı %71, glottik kanserlerde %90 ve subglottik kanserlerde ise %42 dir. İleri laringeal kanserde, evre III'te %60-70 lokal kontrol, beş yıllık sağkalım oranı %60, IV'te %40-50 lokal kontrol ve beş yıllık hayatta kalma oranının %30-40 elde edilir (51).

Tümörün yayılma alanına, hastanın tıbbi durumuna, hastanın ve akrabalarının seçimine ve tedaviyi gerçekleştiren merkezin deneyimine ve olasılığına bağlı olarak, radyasyon tedavisi laringeal kanser için ana tedavi olarak kullanılır (48).

2.2.5.2 CERRAHİ

Cerrahi tedavide primer tümörün ve rejional lenf nodlarının eksizyonu (boyun diseksiyonu) yapılır. Erken glottik kanser lenfadenektomi gerektirmez (40).

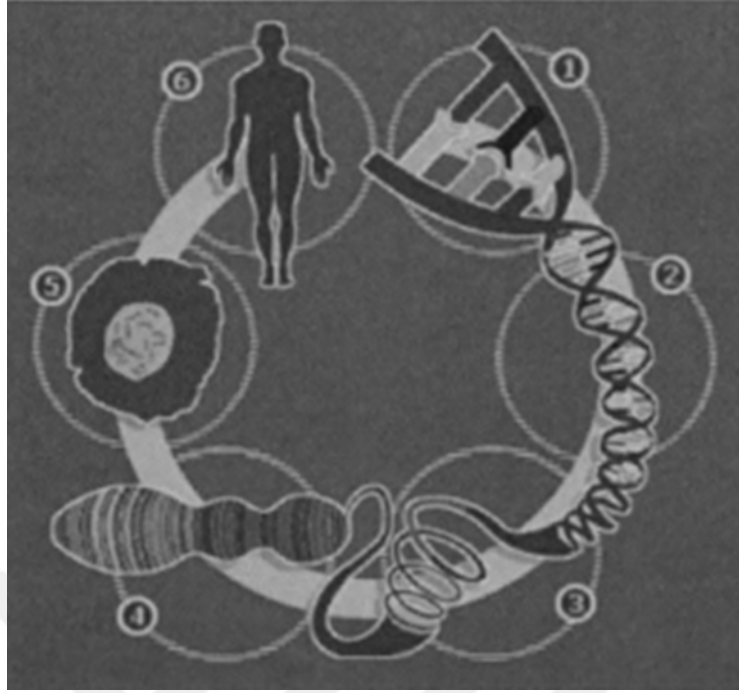
A) Primer tümörün çıkarılması larenjektomi olarak adlandırılır. Parsiyel larenjektomi ve total larenjektomi diye ikiye ayrılır (40).

1) Parsiyel Larenjektomiler

a) **Konservatif Parsiyel Larenjektomiler:** Konservatif larinks cerrahi yöntemleridir. Larinksin fonasyon, nefes ve sfinkter işlevlerini korurlar. Endoskopik veya açık teknik diye ikiye ayrılır (40).

b) **“Non Konservatif Parsiyel Larenjektomi”:** Larinksin fonasyon rolü korunabilmesine karşın solunum fonksiyonunun korunamadığı totale yakın total larenjektomi yöntemidir (40).

2) **Total Larenjektomi:** Bu, tüm larinks, hyoid kemik, supratrakeal halka ve kalıcı trakeotomi dahil normal pre-larinks kaslarının çıkarılmasını içeren cerrahi bir tedavidir. Total larenjektomiden (TL) sonra özofagus sesleri öğretilerek, yapay vibratörlü ekipmanlar kullanılarak veya trakeoözofageal protezler uygulanarak ses rehabilitasyonu yapılabilir (40).



Şekil 2-2 Baş ve Boyun Kanserlerinde Genetik (51)

Baş-boyun kanserlerinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında ve hem tanı hem de tedaviye yönelik seçeneklerin belirlenmesinde "bölge kanserleşmesi" (field cancerization) önemli bir kavramdır. Bu kavram ilk defa 1953'de Slaughter tarafından, oral kanserlerle ilgili olarak ortaya atılmıştır. Geniş mukoza yüzeylerin sigara gibi kanserojenlere uzun süreli maruziyeti sonrasında çok sayıda ve birbirinden bağımsız prekanseröz ve kanseröz odakların gelişmesi olarak açıklanabilir (63).

2.3 İMMÜN SİSTEM

Bağışıklık sistemi genellikle bir savunma mekanizması olarak sunulur. Aslında, bağışıklık sistemi, gelişim, üreme ve yara iyileşmesi gibi temel fizyolojik süreçlerin ayrılmaz bir parçasıdır ve bağışıklık sistemi ile metabolizma, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem gibi diğer vücut sistemleri arasında yakın bir etkileşime sahiptir. Memeli bağışıklık sisteminin temel işlevi, doku homeostazını izlemek, istilacı veya bulaşıcı patojenlere karşı korumak ve hasarlı hücreleri ortadan kaldırmaktır. Bu nedenle, kanserin insanlarda bu kadar yüksek bir sıklıkta ortaya çıkması şaşırtıcıdır (64,65).

Bu nedenle tedavi yaklaşımları kanserin başlamasını ve ilerlemesini etkileyen bu mikroçevre etmenlerini hedef almaya yöneliktir. Kanser hücrelerini çevreleyen alana ait etmenlerin sürekli değişimi tümör oluşumunu, metastazı ve kanser tedavisine karşı

direncini de etkilemektedir. Bu etkileşim çoğu zaman kanserin lehine gelişerek “kanseri hücrelerinin immün sistemden kaçmasına”, tedavi direncine ve kanser gelişimine katkı sağlamaktadır (9).

2.3.1 KONTROL NOKTALARI-MODÜLATÖR

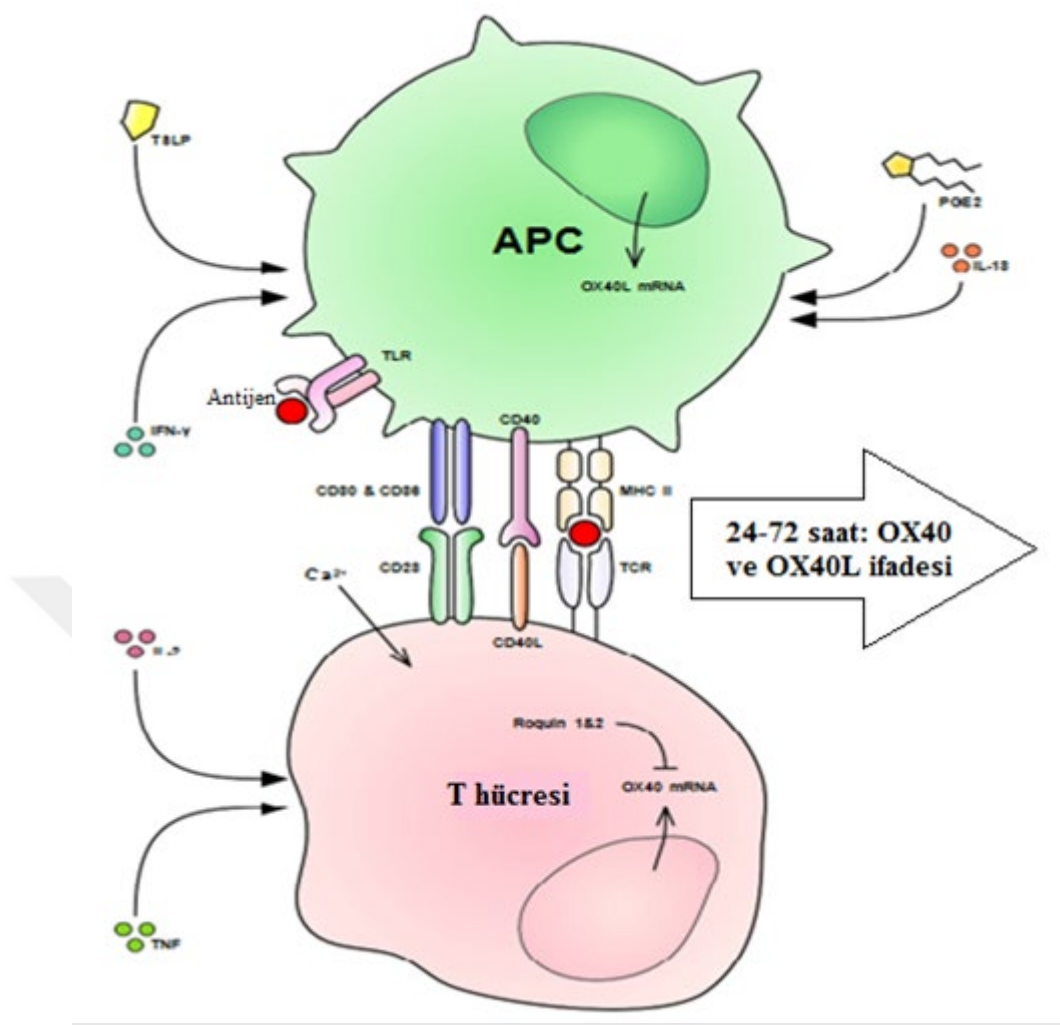
Kontrol noktası inhibitör tedavisinin, etkili tümör gerilemesi ve uzun süreli hastalıksız sağkalım ve sağlamış olduğu dirençle tedaviden etkili bir şekilde faydalanılacak bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden tedaviye yanıt veren bireylerin sayısını artırma girişimleri, sitotoksik T lenfosit ile ilişkili protein (CTLA-4) ve PD-1 veya PD-L1 inhibitörleri ile kombinasyon tedaviye odaklanılmıştır (66);

OX40, düzenleyici T hücreleri (Treg) üzerinde etkilidir ve bu hücrelerdeki ekspresyonu yüksektir. Tümör mikroçevresinde, efektör bellek T hücrelerinde de (Tem) eksprese olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, OX40'ın tetiklenmesi Tem ve Treg üzerindeki çift etkisi tümöre karşı geliştirilen yanıtı indükler. Hem OX40 hem de PD-1, “T hücresi aktivasyonunun” erken aşamalarından itibaren indüklenir, ancak yalnızca PD-1'in süreç boyunca indüklenmesi devam eder, T hücrelerini korur ve karakterize eder. OX40L, aktivasyondan sonra diğer birkaç dendritik hücre, mast hücre ve monosit hücreler ve aktive edilmiş B hücreleri tarafından eksprese edilir (66).

2.3.2 OX40-OX40L EXPRESYONU

2.3.2.1 OX40'IN İFADESİ

OX40'ın ekspresyonunun, aktive edilmiş lenfositler ve özellikle CD4+ T hücreleri üzerinde olduğu doğrulanmıştır. OX40 ekspresyonu pozitif sinyali alan timik T hücrelerinin bir işaretleyicisidir. Ek olarak, NK (doğal öldürücü) hücreleri ve nötrofillerde daha düşük OX40 ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir. Şekil 2-3'da gösterildiği üzere, T hücresi reseptör ligasyonu tek başına CD4+ T hücrelerinde OX40 ekspresyonunu yürütmek için yeterlidir, CD40L, CD80 ve CD86'nın (B7) birlikte uyarılmasıyla CD28 ekspresyonu artar. IL-2, CD4 ve CD8 T hücrelerinde OX40'ı indükleyebilir ve interleukin (IL-1) ve TNF de katkıda bulunur (67,69). Roquin 1 ve 2 proteinleri, protein ekspresyonu sonrası düzenleyicileri olarak işlev görür ve OX40 mRNA'yı bozar: fonksiyonel Roquin eksikliği, “ekspresyonun artmasına neden olur” (77).



Şekil 2-3 OX40 ve OX40L Ekspresyonu, Etkileşimi ve Moleküler Sonuçları (68)

Bekleme durumunda OX40 ve OX40L yok veya minimum ifade edilir. Her ikisinin ekspresyonu, T hücre reseptörüne antijen sunumu ve kostimülasyon moleküllerin (CD80 ve CD86 ile CD28 ve CD40 ile CD40L) kalsiyumun akışını içeren bir mekanizmaya bağlanmasıyla artar. OX40L, hem APC hem de T hücresinde ifade edilir; OX40 ekspresyonu, T hücresi ile sınırlıdır. Saf hücreler üzerindeki ekspresyon 24 ila 72 saat sonra gerçekleşir (68).

OX40 ekspresyonunun, aktive edilmiş T hücreleriyle sınırlı olması yanında, genellikle insan hastalıklarında inflamasyon ve immün aktivasyon alanlarıyla sınırlıdır (69). İnsanlarda, T hücrelerindeki OX40 ekspresyonunun tip 1 diyabet hastalarında otoreaktif hücreleri ile sınırlı olduğu bildirilmiştir (71).

Otoimmünitede, OX40 genellikle inflamasyon bölgelerinde yukarı regüle edilir. OX40, çoklu sistem hastalıklarında (vaskülit gibi) infiltrate lenfositlerde tanımlanabilir, ancak boyamada yalnızca etkilenen organlarda görülebilir; “füzyon dışı kolitte”, boyamada sadece etkilenen bölgenin biyopsisinde ve romatoid artritte görülebilir, inflamasyonlu eklemlerin sinovyal lenfositlerinde, OX40 özellikle yukarı regüledir

(72,74). Kolit lokal hastalıklarda, kolonik OX40+ ekspresyonu, periferik kandaki sistemik ekspresyondaki artışla ilişkili değildir; daha sistemik durumda, genellikle periferik bir artış vardır (68).

Tablo 2-7 İnsan Otoimmün Hastalıklarında OX40 ve OX40L Ekspresyonu (68)

Hastalık	OX40	OX40L
Sistemik lupus eritematoz	Klinik şiddet belirteçleri ile korelasyon ile periferik T hücrelerinde artan OX40 pozitifliği Lupus nefritinde infiltrate perivasküler lökositler üzerine OX40 Artan PI3K /Akt aktivasyonu ile daha aktif fenotip	Glomerüler pozitiflik görünümü ile lupus nefrit hastalarından böbrek biyopsilerinde artmış endotel ekspresyonu Nefritli kişilerde daha fazla yükselme ile artan periferik sOX40L
Kolit	İltihaplı kolondaki lamina propria lenfositlerinde ekspresyon arttı UC'de OX40 pozitif kolonik T hücrelerinin artan oranı; çevresel sayımlar değişmedi Aktif kolitin artmış biyopsi boyaması ve kortikosteroid tedavisi ile değişmemiş	İltihaplı, ancak iltihaplı olmayan kolondan vasküler endotelde artan ekspresyon
Çölyak hastalığı	OX40 pozitif lenfositler hastalıkta bulunur, ancak duodenal biyopsileri kontrol etmez; periferik OX40 ekspresyonu etkilenmedi	
Romatizmal eklem iltihabı	İltihaplı eklemlerden gelen sinoviyal sıvıda lenfositlerde artmış OX40 pozitifliği Azaltılmış sOX40	İltihaplı eklemlerden sinovyumun alt tabakasında OX40L ifadesi Otoantikor durumu ile korelasyon ile artan sOX40L
Enflamatuvar miyozit	OX40 ekspresyonu inflamatuvar miyopatilerde bulunur ancak kontrollerde yoktur	OX40L, inflamatuvar miyopatilerde T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve miyeloid dendritik hücrelerde görülür, ancak kontrollerde görülmez
Üveit	Üveit için enükleasyon yapılan gözlerin siliyer kemiklerinden çoklu OX40 pozitif infiltrate lenfositler	
Tip 1 Diabetes Mellitus	Yeni teşhis edilmiş pediatrik vakaların periferik kanında pozitif CD4+ hücrelerinin artan oranı	
Sistemik skleroz	SLE ve sağlıklı kontrollere kıyasla yükselmiş serum sOX40 konsantrasyonları	
Graves Tiroiditi	Anti-TSHR antikorları olan hastalarda dolaşımdaki CD4+ T hücrelerinin artmış OX40 pozitifliği	Anti-TSHR antikorları olan hastalarda dolaşımdaki CD4+ T hücrelerinin OX40L pozitifliğinde artış sOX40L yükselticileri
Multipl Skleroz	OX40+ CD26+ periferik CD4+ T hücrelerinde azalma, natalizumab tedavisinden sonra klinik yanıtla korelasyonlu OX40, MS beyin ve kordon bölümlerinde ifade edilir	
Nöromiyelitis optika	Patolojik beyin örneklerinde artan OX40 pozitifliği	
Sjögren	Periferik T hücrelerinde artan OX40	Periferik B hücreleri ve monositlerde artmış

sendromu	ekspresyonu	OX40L ekspresyonu
Miyastenia gravis	Germinal merkezler çevresinde artmış timik OX40 boyaması Periferik CD4+ T hücrelerinde artmış OX40 boyaması	OX40L miyastenia gravis tiroidinde bulunur ancak kontrolde değildir
Wegener granülomatozu	CD8+ periferik T hücrelerinde ve CD4+ T hücrelerinde artan OX40 ekspresyonu OX40-etkilendiğinde birden fazla organdaki lenfositler üzerinde pozitifliği	
Henoch-Schönlein purpurası	Dolaşımdaki CD4+ T hücrelerinde artan OX40 pozitifliği	Arttırılmış sOX40L

Genellikle sistemik otoimmün ekspresyon ve hastalık şiddeti arasında bir bağlantı vardır; örneğin, sistemik lupus eritematozusta (SLE) olduğu gibi. Multipl skleroz tedavisinde, natalizumab, OX40'ı eksprese eden dolaşımdaki lenfositlerin oranını azaltabilir **(75,78)**.

Deneyisel hayvan çalışmalarında, tip1 diyabette (T1DM), patojenik antijenlerin özgülüğünü ve OX40 ve CD25'in (IL2Ra) ko ekspresyonunu ve dolaşımdaki lenfositler üzerindeki OX40 ekspresyonu güçlü bir şekilde gösterilmektedir. OX40 ekspresyonunun artmış lenfosit aktivitesi ile ilişkisi, Treg'deki OX40 mRNA'nın T1DM'de azalması ile de ilişkilendirilmiştir **(71,79,80)**.

OX40, saf T hücrelerinin aksine, murin Treg'lerde yapısal olarak eksprese edilir. Ayrıca OX40'ın Treg'lerde, özellikle tümör bölgelerinden izole edilenlerde, daha fazla eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu nedenle, antikör terapisinin bu hücreleri tercihli olarak hedeflemesinin mümkün olabileceği bildirilmiştir **(81)**.

OX40 ekspresyonu, otoimmün modellerde immün aktivasyon bölgeleri ile sınırlıdır. Örneğin, dalağın periferik kanında, EAE sıçanlarının lenf düğümlerinde ve sinir dokularında “önemli farklılıklar olmaksızın artmıştır” **(82)**. OX40'ın, tiroitli farelerin tiroid ve dalağında, “kollajen kaynaklı artritli (CIA) hayvanların eklemlerinde” ve üveitli farelerin gözlerindeki ekspresyonu da gösterilmiştir **(68)**.

Mycobacterium tuberculosis ve adjuvanlar ile tedavi edilen sıçanlarda poliartrit gelişebilir. Bu modelde, OX40 ekspresyonu, iltihaplı eklemlerin drene olan lenf düğümlerinde ve “klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce” görülmektedir **(83)**.

OX40, farelerde olduğu gibi insan kanser ilişkili treg'de yüksek oranda ifade edilir, IL10 üretimini inhibe ederek indüklenebilir ve doğal treg fonksiyonunu bloke edebilir **(68)**.

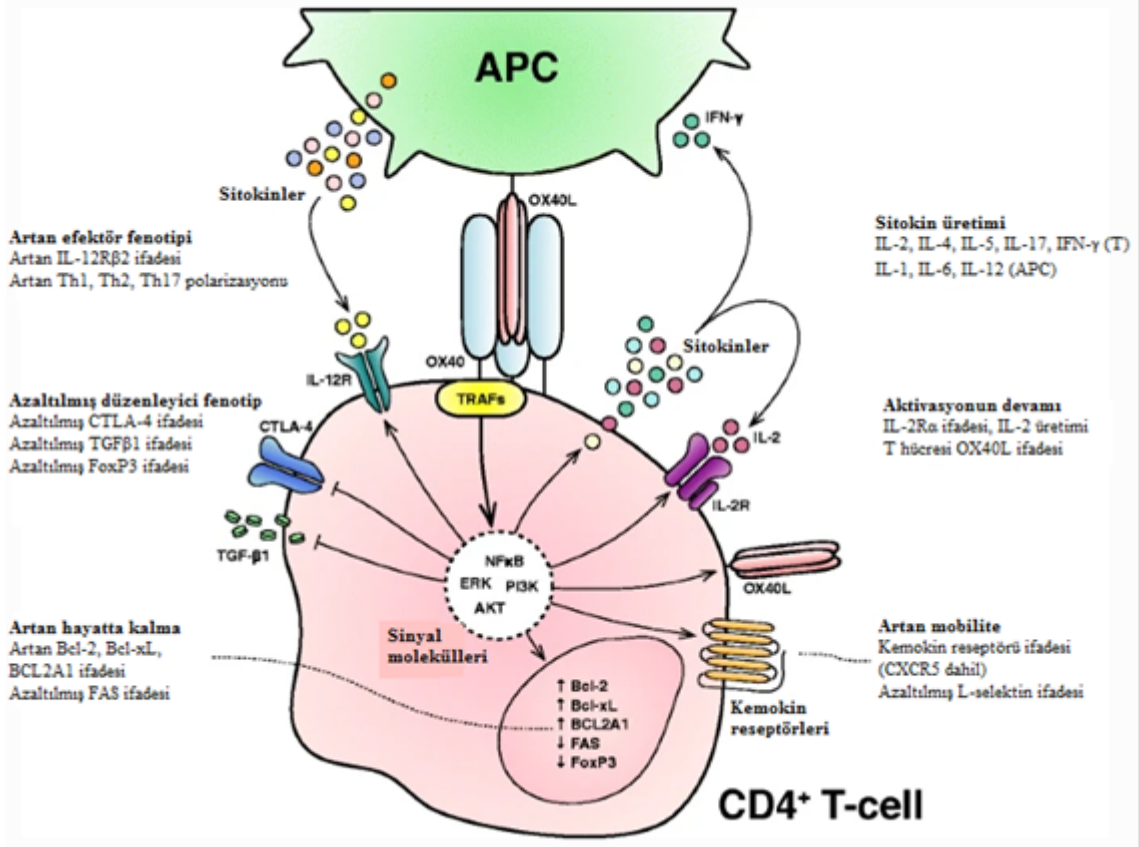
2.3.2.2 OX40 LİGAND'IN İFADESİ

OX40L ekspresyonu, çeşitli antijen sunan hücrelerde antijen sunumuna yanıt olarak yukarı regüle edilir: B hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücreler, mast hücreleri, bronşiyal düz kas, habis tümörler, vasküler endotel hücreleri ve Langerhans hücreleri üzerinde eksprese edilir (68). CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde de OX40L'nin ifadesi bulunmakta ve bu hücreler IL-12'ye maruz kaldıklarında OX40L ifadesinin arttığı gösterilmiştir (84,86). OX40L ifadesini destekleyen ve eşlik eden eş uyarıcı faktörler arasında prostaglandin E2, “timik stromal lenfopoietin (TSLP)” ve IL-18, interferony (IFN γ) bulunur. Ayrıca yaşla birlikte, insan serumunda çözünen OX40L'nin düzeyinin arttığı gösterilmiştir (68,87).

OX40L, klinik olarak önemli inflamasyon alanlarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Otoimmün hastalıklarda bölgeye özgü bir şekilde ifade edilmektedir. Örneğin, immün aracılı nefritte gösterildiği gibi, inflamasyon bölgesinde ifade belirgindir. Ayrıca “anti-diyabetik obez olmayan diyabetik (NOD)” farelerin pankreas ve ikincil lenfatik organlarında; “Lupus benzeri nefrite duyarlı böbrek hastalığı” olan BXSB farelerinde ve CD4 CD45RB metastatik kolitinde, kolondaki infiltrat lenfositlerde OX40L ekspresyonu gösterilmiştir. Bunun yanında, sistemik olarak, SLE hastalarının serumundaki OX40L'nin mRNA'sı ve TRAF2'si yüksekliği gösterilmiştir (68,75,88,90).

2.3.3 OX40-OX40 LİGAND ETKİLEŞİMLERİNİN FONKSİYONLARI

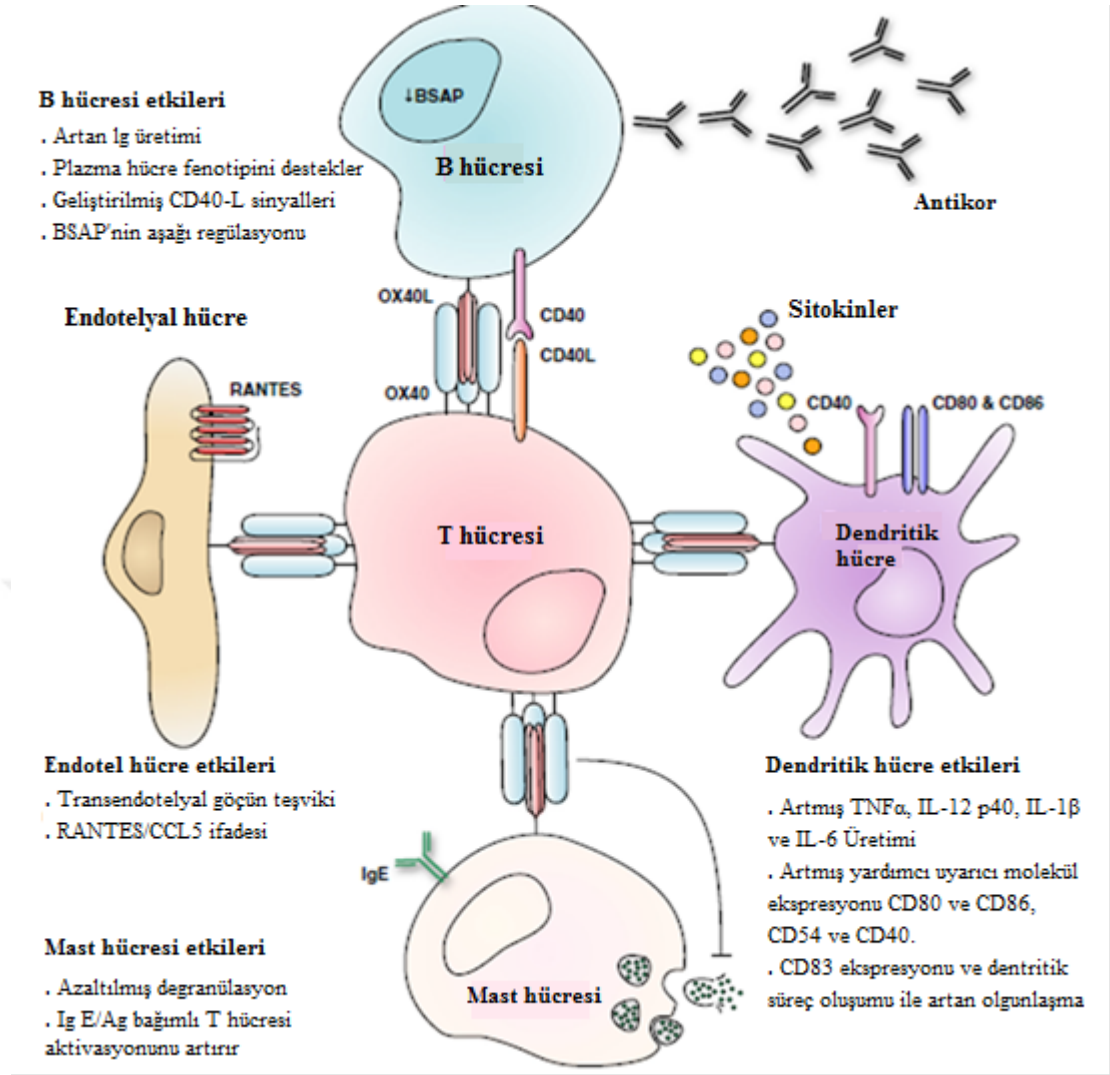
OX40-OX40L etkileşiminin, OX40L ifade eden hücreler üzerinde çok etkisi vardır. Etkileşimin OX40L'ı ifade eden hücrenin aktivitesini de arttırdığı belirtilmiş ancak OX40L'nin OX40'a bağlanmasının moleküler olayları, (Şekil 2-4, 2-5, 2-6) birçok proinflamatuvar aracı ile etkileşime girmesine rağmen tam olarak açıklanmamıştır. OX40-OX40L etkileşiminin T hücrelerinin proliferatif yanıtını arttırdığı göstermiştir. Bu nedenle, OX40 veya OX40L'den yoksun farelerde, CD4⁺ genişlemesi azalır ve dendritik hücre (DC) veya OX40L ekspresyonu, aktif CD4⁺ T hücrelerinin sayısını, hücre uyarılma yeteneğini ve T hücre polarizasyonunu artırır. OX40L, efektör sitokinlerin üretimini ve kısmen mRNA'nın stabilizasyonu aktivasyonu da arttırdığı gösterilmiştir (68,91).



Şekil 2-4 OX40 Ligasyonunun T Hücreleri Üzerindeki Etkileri (68)

Oklar, olumlu etkileri belirtir; çubuklu çizgiler, olumsuz etkileri belirtir; kesik çizgiler ilişkiyi gösterir.

T hücre bölünmesi, hayatta kalma ve sitokin üretimi PI3K/PKB, NFκB sinyal yolları ile ve NFAT aracılı, OX40-OX40L etkileşimi ile tanımlanmıştır (81).



Şekil 2-6 OX40L Ligasyonunun T Olmayan Hücreler Üzerindeki Etkileri (68)

OX40 ve T Hücresi Regülasyonu

T hücrelerinde OX40L'yi eksprese eden farelerde, otoimmünitenin yanı sıra dalaklarında Treg sayısında artışa neden olmaktadır. OX40L'nin OX40 ile CD4 T hücreleri üzerine bağlanması, otokrin IL-4 üretimi sonucunda Th2 hücre üretimi, IL-12 veya Tip I interferonların varlığında, Th1 farklılaşmasına neden olur. TCR ve OX40 sinyalleri arasındaki sinerji, PKB aktivasyonu yoluyla survivin ve Aurora B kinaz ekspresyonunu artırır. Bu iki protein, hücre döngüsünde G1-S fazının ilerlemesine ve T hücre mitozunda kinazların aktivitesini desteklemek için birlikte işlev görür. OX40, TCR sinyal gücünü diğer TNFRSF üyeleriyle birleştirir ve düzenler. OX40'ın yokluğunda Th1 tepkisinin bozulmasına ve Th2 tepkisinin normal kaldığı da bilinmektedir (68,81). OX40 agonistleri, sitokin ortamında önemli olmasına rağmen,

TGF β ile tedavi edilen kültürlerde Treg genişlemesini yönlendirebilir. IFN γ ve IL-4 mevcutsa, efektör CD4 $^{+}$ amplifiye edilir; IL-4 ve IFN γ 'yi bloke ederek Treg'ler amplifiye edilir. Bununla birlikte, IL-2 olmadan OX40 uyarımı zayıf proliferasyon üretir ve Treg'i inhibe etme kabiliyeti zayıfken, ekzojen IL-2 bu durumu düzeltmek için yeterlidir. “Çeşitli kanser modellerinde”, tümöre enjekte edilen agonistik anti-OX40, Treg'in inaktivasyonuna ve tükenmesine ve tümör gerilemesine aracılık eder (94). Benzer şekilde OX40, yerleşik "ICOS+IL-10" Treg'in genişletme ve düzenleme yeteneklerini engeller. OX40 CD4 $^{+}$ T hücrelerinin Th1 veya Th2 alt gruplarına, Th17 yardımcı hücrelerinin üretiminde, farklılaşmasına ve genişlemesine neden olur ve Th17 aracılı hastalıkların tedavisinde rol oynadığı hem in vitro hem de in vivo modellerde gösterilmiştir (68,81,92,94).

OX40, CD4 $^{+}$ T Hücre Belleğini Artırır ve Sürdürür

OX40 varlığında, “antijene özgü TRAF2'ye” bağlı bir şekilde bellek hücrelerinin sayısı artar ayrıca OX40, bellek T hücresi aracılı allogreft reddinde etkili reaktivasyonun gelişiminde rol oynamaktadır (95,96). TRAF2 ve 5'in NF κ B sinyal yolağını aktive ettiği de gösterilmiştir. NF κ B yollarının sinyaliyle, OX40 aktivasyonunun, apoptoz baskılanmasına ve hücre sağkalımının artmasına neden olan B hücreli lenfoma (Bcl-2), B hücreli lenfoma ekstra büyük (Bcl-XL) ve Bfl-1 (A1) dahil olmak üzere anti-apoptotik proteinin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (81).

OX40 Bellek CD8 $^{+}$ T Hücrelerinin Oluşturulmasını Teşvik Eder

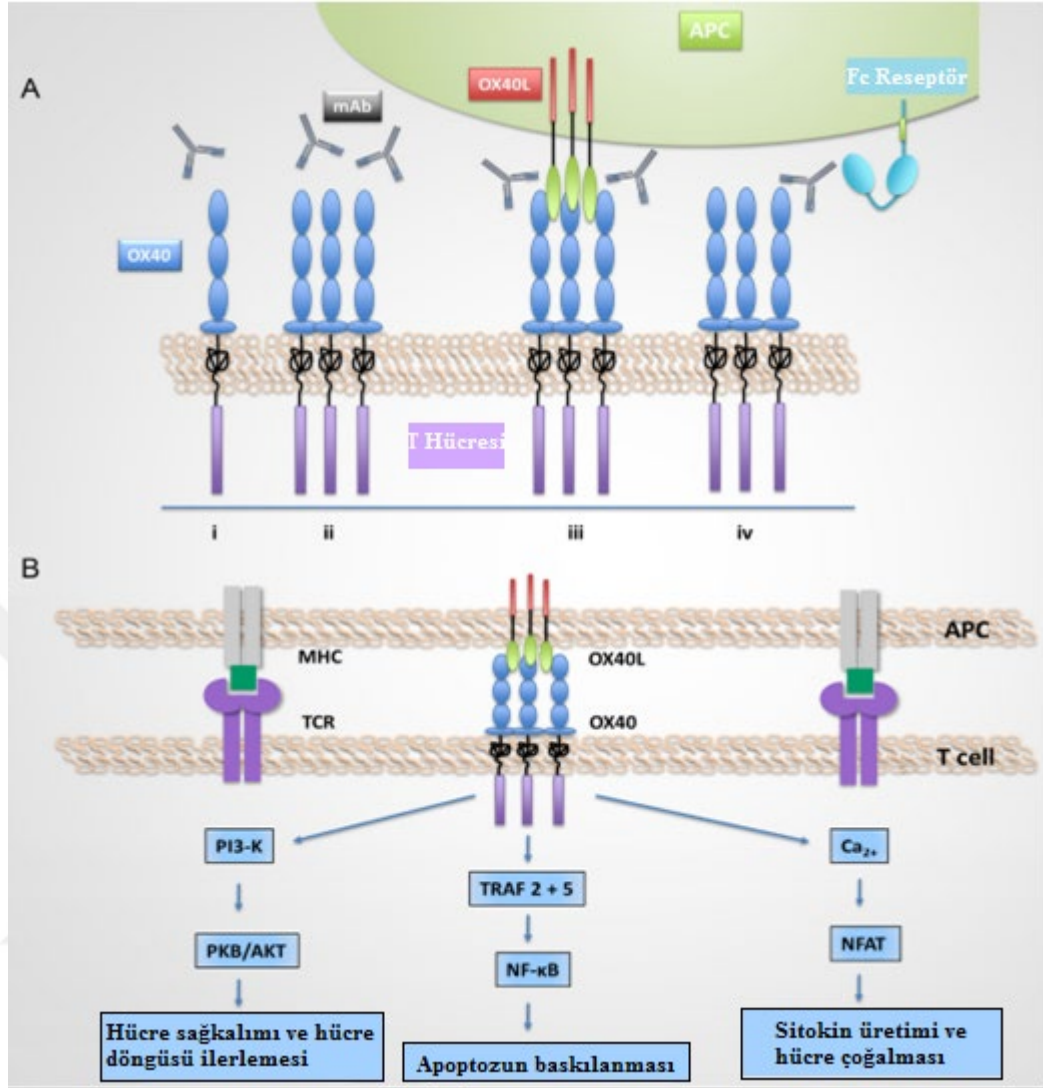
OX40-OX40L etkileşimi, sitotoksik CD8 $^{+}$ T hücrelerinde CD4 $^{+}$ T hücrelerine benzer etkilere sahiptir: ilk aktivasyon yokluğu ile inhibe edilmez ve viral enfeksiyona tepkiler sürdürülür. OX40, CD8 $^{+}$ T hücrelerinin hayatta kalmasına ve antijene özgü hücrelerin üretilmesini ve sürdürülmesini destekler. OX40L etkileşimi olmadan, CD8 aracılı allogreft reddi bozulur ve bazı modellerde, OX40 agonistleri ile tedavi, anti-tümör bağışıklığını artırabilir; ve buda CD8 $^{+}$ T hücreleri ile olmaktadır (68,97,98).

OX40 Etkileşimleri Yapışma ve Göçü Kolaylaştırır

OX40-OX40L etkileşimi, aktif T hücrelerinin endotelyuma yapışmasını ve ardından göçü teşvik eder. OX40L bloker, T hücrelerinin “kültürlenmiş vasküler endotelial hücrelere” yapışmasını azaltabilir. Dendritik hücreler üzerinde OX40L ekspresyonu olan farelerde, CD4 $^{+}$ T hücreleri indüklenen lenfoid dokularda daha

fazladır ve artan proliferasyon göçü artırır **(99,100)**. OX40'dan yoksun T hücreleri, OX40'lı T hücrelerine göre in vitro olarak daha hızlı çoğalır, ancak daha az hayatta kalır. OX40 olmadan CD8⁺ T hücreleri kusurlu proliferasyon, azalmış sağkalım ve zayıf bellek üretimi gösterir. OX40L etkileşimi, göçle ilgili birçok molekülü yukarı düzenler. TCR sinyali ile birlikte OX40 ligasyonu kalsiyum akışını ve NFAT aktivasyonunu artırır. Bu da, IL-2, IL-4, IL-5 ve İnterferon (IFN) gibi sitokinlerin üretiminde rol oynar. OX40 çoğalmayı artırma, apoptozu baskılama ve T hücrelerinden daha fazla sitokin yanıtı indüklemeye potansiyeline sahiptir. Hayvanlarda, OX40'dan yoksun T hücrelerinin sadece efektör fonksiyonları azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda bunların iltihaplanma bölgesine ulaşmasını da önlediğine dair kanıtlar vardır **(68,81)**.





Şekil 2-7 OX40 Aktivasyon Mekanizmaları ve Akış Aşağı Sinyalleme Etkileri (81)

(A) OX40'ın OX40L ve monoklonal antikorlar (mAbs) ile potansiyel etkileşim mekanizmaları. (i) Monomerik OX40 ile iki değerlikli mAb bağlanması. (ii) Önceden kümelenmiş OX40 ile iki değerlikli mAb bağlanması. (iii) OX40L destekli mAb aracılı sinyalleşme. (iv) Fc gama reseptörü (FcR) destekli mAb sinyali (izotip ve spesifik FcR'ye bağlı olacaktır). (B) OX40'ın aşağı akışındaki bilinen sinyal yolları. OX40-OX40L etkileşimleri, NFκB sinyal yolağını doğrudan etkinleştirebilir ve TCR'nin aşağı akışındaki sinyal yollarını, örneğin PI3K/PKB ve NFAT'ı arttırabilir. Bu sinyal yolları, sitokin salınımının yanı sıra sürekli hayatta kalma ve artan proliferasyon ile bağlantılı etkilere neden olur (81).

OX40 - Treg Etkileşimi

Treg Gelişiminde OX40'ın Rolü

Treg gelişimindeki OX40'ın rolü, TNFR ailesi üyelerinin işbirliği ile olmaktadır. OX40 sinyalleşmesinin, miR155/SOCS1'e bağlı bir mekanizma yoluyla Treg'lerin IL-2 sinyaline tepkisini değiştirdiği gösterilmiştir (100). Treg homeostazı için IL-2 gerekli

olduğundan, OX40'ın nTregs gelişimine katkıda bulunduğu olası bir mekanizmadır **(101)**. Polarize edici sitokinlerde interferon gamma (IFN γ) ve IL-4'te bir artış olduğunu ve bunlar nötralize edildiğinde, OX40 sinyalleşmesinin aslında iTregs gelişimini arttırdığı ortaya çıkmıştır **(102)**. OX40 sinyalleşmesinin iTreg gelişimini inhibe ettiği başka bir olası mekanizma Foxp3 ekspresyonunun modülasyonudur. OX40'ın Foxp3 ekspresyonunu etkileyebilmesinin **(103)** olası bir yolu, fosfo-Smad3 (pSmad3) ve Stat3'ün Foxp3 promotörüne bağlanmasıyla olmaktadır. Başka bir olasılık dolaylı olarak sitokin ortamının modülasyonudur **(104)**. OX40 sinyalleşmesinin insan iTreg'lerin indüksiyonuna zararlı olduğu gösterilmiştir. OX40 antikorlarının, hem IL-10 üreten düzenleyici hücrelerin oluşumunu hem de Tümör Büyüme Faktörü beta (TGF β) tarafından indüklenen hücreleri bloke ettiği gösterilmiştir **(81)**.

Treg İşlevini Düzenlenmesinde OX40'ın Rolü

OX40, Knockout (KO) Treg'lerin, defektin ve mast hücresi degranülasyonunun baskılama kapasitesini azaltır **(105)**. Proliferasyon indüklenmesi, Treg baskılayıcı aktivitesinin kaybına neden olmaktadır. Bununla birlikte, in vivo Treg'lerin baskılayıcı kapasitelerini kaybetmeden yoğun bir şekilde çoğaldıkları bilinmektedir **(106)**. Agonist anti-OX40 antikorunun (OX86) veya OX40L'yi aşırı eksprese eden APC'ler Treglerin hem in vitro hem de in vivo çoğalmasına ve genişlemesine yol açmaktadır, ancak OX86 antikorunu diğer çalışmalarda Treg proliferasyonunu indükleyememiştir **(107)**. OX40 sinyalleşmesinin efektör T hücrelerin ve Treglerin hayatta kalması için önemli olduğu gösterilmiştir. OX40 sinyali yoluyla, mAb aracılı immünoterapide, Treg işlevselliğinin bastırılması mAb antikoruyla gerçekleşir **(81)**.

OX40'ın İnsan Treg Fonksiyonu Üzerindeki Rolü

Kronik hepatit C hastalarından izole edilen Tregler OX40'dan daha baskıcı olduğunu ve OX40L+APC'leri tarafından sağlanan ek OX40 sinyalleşmesinin Treglerin baskılayıcı işlevini değiştiremediğini gösterilmiştir **(108)**. Diğer bir çalışmada, CD4 bellek çoğalmasını indükleyen anti-OX40 antikorların, Treg aracılı supresyonu bloke ettiğini gösterilmiştir. Agonistik OX40 antikoruna sahip Tregler, murin çalışmalarında olduğu gibi OX40 sinyallerin Treg çoğalmasına neden olmuştur. OX40 sinyali Treglerin genişlemesi ve fonksiyonunu arttırabilir **(81,109)**.

İmmünoterapötik Bir Hedef Olarak OX40

OX40'ın immünoterapide olumlu bir etkisi olduğu vurgulanmaktadır. OX40 sinyalinin modüle edilmesi hem otoimmünite hemde anti-kanser terapötikleri için bağışıklık uyarımına aracılık etme potansiyeline sahiptir. OX40-OX40L etkileşimi, baskın efektörü çok çeşitli iltihaplanma, kanser ve otoimmünite modellerinde hedeflenmiştir (81).

Otoimmün ve İnflamatuvar Hastalıklarda OX40

Enflamatuvar veya otoimmünitede, bağışıklık sisteminin hücreleri hiperaktiftir. EAE, astım, kolit, artrit ve Graft-Versus-Host Hastalık (GVHD)'ta OX40'ın rol oynadığı ve OX40-OX40L etkileşimi ile CD4 efektör fonksiyonuyla hastalığın iyileştirilebileceği gösterilmiştir. OX40 ekspresyonu Tregler ve CD4'lerde yüksektir bu nedenle CD4'lerin terapötik bir hedef olabileceği düşünülmektedir (81).

2.3.4 KANSER-OX40 İLİŞKİSİ

Terapötik bir ajan olarak OX40, hem anti-OX40 mAb'lar hemde OX40L-Fc füzyon proteinleri kullanarak immünojenik modellerde tümör gerilemesine neden olduğu gösterilmiştir. OX40'a bağlı anti-tümör bağışık, CD8+ ve CD4+ T hücrelerinin genişlemesini gerektirmiştir; yukarıda tartışıldığı gibi, bazı modellerde Treg tükenmesi OX40 tedavisinin önemli bir bileşeni olduğunu göstermiştir (81).

2.3.5 GEN POLİMORFİZMİ VE KANSERE YATKINLIK

Bazı popülasyonlarda, hastalığa yanıtındaki bireysel farklılıklar, genomdaki değişikliklerin neden olduğu polimorfizmlerden kaynaklanmaktadır. Polimorfizmler, hastalıkların gelişmesine, ilaçların bireyler üzerindeki yan etkilerine ve bireyin ilaçlara tepkisine yol açabilen genetik belirteçler olarak kullanılmaktadır (14).

Polimorfizmin belirli bir fenotip veya davranışsal sonuçla ilişkilendirildiği mekanik temeli anlamak ve polimorfizmin işlevsel olup olmadığını (yani, bir genin veya gen setinin işlevini değiştirip değiştirmediğini) bilmek önemlidir. Bazı durumlarda, ilişkili bir polimorfizmin işlevi tanımlanmamıştır ve bu polimorfizmi içeren gen üzerinde bir etki olduğu tahmin edilmektedir (110).

2.3.6 SNP

Polimorfizm, popölasyonda %1'den daha yüksek bir frekansla lokusta en az 2 farklı allelin ortaya çıkması ile ilişkilidir. Polimorfizmlerde tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve değişken sayıda ardışık tekrarların polimorfizmini bulabiliriz. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) yalnızca tek bir bazın mutasyonundan kaynaklanmaktadır. SNP, hastalığa yatkınlık, hastalığın patogenezi ve spesifik ilaçların etkinliği ile ilgilidir. SNP'leri klinik olarak tespit etmek önemlidir. SNP'leri veya mutasyonları ayırt etme/tespit etme yöntemleri oldukça spesifik ve hassastır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) birçok moleküler analiz için gerekli analitik performansı sağlamaktadır (111).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmamıza “T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi KBB Kliniği” ve “İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Ana Bilim Dalı” tarafından “Larinks Kanseri tanısı konmuş” 80 hasta ve 111 “sağlıklı kontrolden alınan örnekler dahil edilmiştir”. Çalışmaya dahil edilen her birey bilgilendirilmiş ve onam formu imzalatılmıştır. İstanbul üniversitesi "İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" izniyle çalışmamız başlatılmıştır.

3.2. Kullanılan Gereçler

Kullanılan Cihazlar: Buzdolabı, Santrifüj, Mikrosantrifüj, Etüv, Otomatik Pipetler, Vorteks, PCR Cihazı (T100TM Thermal Cycler) ve (AB Applied Biosystems), Hassas Terazi, Mikrodalga Fırın, Spektrofotometre Cihazı, Jel Görüntüleme Sistemi (EL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM), Jel Elektroforez Sistemi (EC250-90 E-C Apparatus Corporation), Elisa Okuyucusu.

3.3. Kullanılan Malzemeler:

“DNA/RNA/Protein İzolasyon Kiti”, “Taq DNA Polymerase (Intron i-StarTaq)”, 2,5mM dNTP Mix, OX40 Primer Çifti, OX40L Primer Çifti, BsaI Kesim Enzimi, BmrI Kesim Enzimi, Agarose, 10X TBE Buffer, “6X DNA Loading Dye”, 100bp DNA Ladder, Dual snap-cap PP, 14ml, “1,5ml Eppendorf Tüp”, 0,2ml PCR Tüp, 10µl Beyaz Pipet Ucu, “200µl Sarı Pipet Ucu”, 1000µl Mavi Pipet Ucu, 10µl Filtreli Pipet Ucu, 100µl Filtreli Pipet Ucu, “1000µl Filtreli Pipet Ucu”, OX40L Elisa Kit

3.4. Kullanılan Çözeltiler:

5XTBE

-54 g Tris Base

-27,5 g Borik asid

-20 ml EDTA (0,5M PH:8)

3.5. Kullanılan Laboratuvar İşlemleri:

3.5.1. DNA İzolasyonu

“Hasta ve kontrol gurubun kan örnekleri” EDTA içeren test tüplerine konuldu. Spin kolon yöntemiyle kan örneklerinden DNA'yı ayırmak için “Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit'i” kullanıldı. Spektrofotometre cihazıyla 260-280nm dalga boyunda elde edilen DNA'ların “konsantrasyon ve saflık tayinleri yapılmıştır”.

Jel hazırlama

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %2'lük agaroz jel hazırlanmıştır. 4g agaroz tartılarak behere alınmıştır. Üzerine 200ml 1XTBE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında ısıtılmıştır. Daha sonra üzerine 10µl 10mg/ml'lik etidyum bromür eklenerek karıştırılmıştır. Yaklaşık 70°C'ye soğutularak küvete dökülmüştür. Tarak yerleştirilmiştir ve jel soğumaya bırakılmıştır.

Boya

Agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı belirlemek için flüoresan bir boya olan EtBr (Etidyum Bromür) kullanılmıştır. DNA baz çiftlerinin arasına bağlanarak DNA'nın görülmesini sağlar.

Jel Yükleme Tamponu (Loading Dye)

DNA örneği jele yüklenmeden önce yükleme boyası ile karıştırılmıştır.

Yükleme tamponunun kullanım amacı;

- 1) DNA yoğunluğunu arttırarak örneğin kuyuya çökmesini sağlar.
- 2) Örneği yükleme sırasında boyar kolay görünür hale getirir.
- 3) Boya içerdiğinden yürüdüğü yeri belirtir (anoda doğru).

3.5.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR yöntemiyle, primerler kullanılarak ilgili spesifik gen bölgeleri “(T100TM Thermal Cycler) cihazı ve (AB Applied Biosystems)” cihazında çoğaltılmıştır. Her bölge için kullanılan primer dizisi ve primer bağlanma sıcaklığı (Tablo 3-1) da verilmiştir. PCR karışımı, toplam hacmi 25µl olacak şekilde aşağıdaki gibi hazırlanır:

H₂O 11µl

dNTP 1,5µl

MgCl₂ 1,7µl

MgFree PCR tamponu 2,5µl

F Primer (10 pmol) 0,5µl

R Primer (10 pmol) 0,5µl

Taq DNA polimeraz 0,3µl

DNA 7µl

Tablo 3-1 Kullanılan primerler

Çalışılan Bölge	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı
OX40 rs17568	F; TTCAGCAGTGGCAGTGGTAG	59°C/35 döngü
	R; TGGGAAAGTGGAACTGGTCT	
OX40L rs1234313	F; TGTGGTAGATGCTGCCTGTG	60°C/35 döngü
	R; CCCTTCTCCTATTCGGGTTG	

3.5.3. “Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi”

PCR sonrası “ilgili gen polimorfizmlerinin saptanması” için PCR ürünleri OX40 rs17568 BsaI Kesim Enzimi, OX40L rs1234313 BmrI Kesim Enzimleriyle her bir enzim için saptanacak olan optimum sıcaklıkta ve sürede “inkübasyona tabi tutularak kesimi yapılmıştır” (Tablo 3-2). Kesim sonrası ürünler, analiz için bir “agaroz jel üzerinde elektroforeze” tabi tutuldu.

Tablo 3-2 Kullanılan enzim ve kesim sıcaklığı ve süresi

Çalışılan Bölge	Restriksiyon Enzimi	Kesim Sıcaklığı/Süresi
OX40 rs17568	BsaI	55°C/2 saat
OX40L rs1234313	BmrI	65°C/2saat

3.5.4. “Agaroz Jel Elektroforezi”

Örnekler “agaroz jel elektroforezinde” hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 voltluk “(EC250-90 E-C Apparatus Corporation)” elektrik akımında yürütülmüş ve

“(EL LOGIC 100 IMAGING SYSTEM)” cihazında polaroid kamera ile jelin fotoğrafı çekilmiştir.

- Homozigot (GG genotipi) » 359bp
- Heterozigot (AG genotipi) » 359bp + 198bp + 161bp
- Homozigot (AA genotipi) » 198bp + 161bp ile tanımlanmıştır.

3.5.5. Protein Düzeyinin Elisa Yöntemi İle Tayini

Çalışmada ticari olarak "İnvitrogen" 'den alınan "Human Soluble sOX40 ELISA Kit" ve "Abcam" 'den alınan "Human Soluble OX40L ELISA Kit" test kiti (KTE60202) kullanılmıştır. Örnekler kittede önerilen protokola uygun olarak Sample Diluent ile sulandırıldı. Her bir örnek kuyusuna kit protokollerine uygun sample diluent solüsyonu, üzerine yine kittede belirtilen “hasta ve kontrol grubu serum örneklerinden” eklendi. 45 dakika 37°C inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüm kuyulara 250µl yıkama solüsyon tamponu eklendi ve 5 kez yıkandı. Daha sonra 50µl "HRP-Konjugat" eklenerek plate kaplanıp 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar aynı şekilde 250µl yıkama tamponu eklenerek 5 kez iyice yıkandı. Kuyucuklara daha sonra 50'şer µl "kromojen A ve B" eklendikten sonra, 15 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi ve her kuyucuğa 100µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi, ve 15dk içinde "ELISA cihazı'na okutuldu. Sonuçlar "ELISA" okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okutuldu ve pg/ml olarak hesaplanmıştır. Kitin "sensitivity" değeri sırasıyla 1,8pg/ml ve 0,1pg/ml'den daha düşük olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda istatistik analizler SPSS 22.1 programı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SNP verilerin analizinde Fisher ki-kare testi ve ELISA verilerinin analizinde Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. Anlamlılık sınırı olarak $p < 0,05$ Kabul edildi. Riskler, %95 güven aralığı (CI'ler) ile olasılık oranları (OR'ler) olarak değerlendirildi. Ayrıca bağlantı dengesizliliği analizi için “Haploview 4,2 programı” programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Veriler

Çalışmaya hasta grubu olarak 80 (6 kadın, 74 erkek) ve kontrol grubu olarak 111 (52 kadın, 59 erkek) birey dahil edilmiştir ($p<0,001$). Hasta grubuna ait yaş ortalaması $61\pm1,104$ iken kontrol grubuna ait yaş ortalaması $57,444\pm1,6496$ 'dır ($p=0,07$) (**Tablo 4-1**).

Hastaların klinik ve histopatolojik verileri Tablo 4-1 de verilmiştir.

Olgular sigara kullanımı, reflü, alkol kullanımı, ailede kanser hikayesi, tümör derecesi, Lenf nod tutulumu, uzak metastaz varlığı, farklılaşma, perinöral invazyon, nüks parametrelerine (Tablo 4-1) göre dağılımları yapıldı. Çalışmamızda sigara kullanımı %55, alkol kullanımı %56,9, tümör derecesi ileri evre (T3-T4) %44,4-%29,2, istatistiksel anlamlı bir fark bulunduğu ve tümör derecesi evre (T1-T2) %8,3-%18,1, lenf nodu tutulumu (N0) %52,8 oranında “istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadığı” tespit edilmiştir. Farklılaşma orta olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4-1 Larinks hastalarına ait karakteristik özellikler

Parametreler		Larinks Kanseri Hastaları	
		n	%
Sigara kullanımı	Var	44	55
	Yok	36	45
Reflü	Var	31	38,8
	Yok	49	61,2
Alkol kullanımı	Var	41	56,9
	Yok	31	43,1
Ailede Kanser Hikayesi	Var	25	31,2
	Yok	55	68,8
Tümör derecesi	T1	6	8,3
	T2	13	18,1
	T3	32	44,4
	T4	21	29,2
Lenf nod tutulumu	N0	38	52,8
	N1	29	40,3
	N2	3	4,2

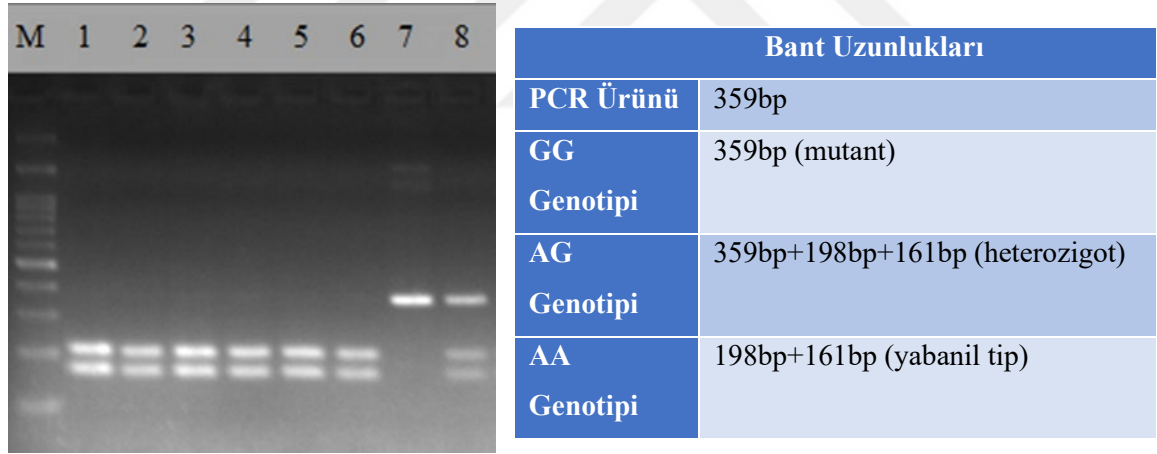
	N3	2	2,8
Uzak Metastaz Varlığı	Var	2	2,8
	Yok	70	97,2
Farklılaşma	Az	8	16
	Orta	34	68
	İyi	8	16
Perinöral invazyon	Var	17	23,6
	Yok	55	76,4
Nüks	Var	8	10,1
	Yok	71	89,9

*8 kişinin patoloji raporuna ulaşılammıştır.

4.2. Çalışılan Genlere Ait Bulgular

4.2.1. OX40 rs17568 A/G Polimorfizmine Ait Bulgular

OX40 rs17568 A/G Polimorfizmine ait BsaI restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 4-1'de verilmiştir.



Şekil 4-1 OX40 rs17568 bölgesi kesim ürünleri

M: DNA Ladder, 1-6 nolu örnekler: AA genotipi, 7 nolu örnek: GG genotipi, 8 nolu örnek: AG genotipi

İlgili polimorfik bölgeye ait genotip dağılımları “hasta ve kontrol grupları arasında” karşılaştırıldı. İki grup arasında genotip dağılımı açısından “anlamlı bir fark bulunmadığı” belirlendi ($p=0,500$) (Tablo 4-2). Hasta grubunda OX40 rs17568 genotip dağılımları ve allel taşıma durumları ayrıca sigara kullanımı, alkol kullanımı, ailede kanser hikayesi, reflü varlığı, perinöral invazyon, tümör derecesi, nod metastaz durumu, uzak metastaz, farklılaşma derecesi ve nüks gelişmesi parametreleri ile beraber incelenmiş ve gruplara ait genotip frekansları Tablo 4-2'de verilmiştir. OX40 rs17568'e

ait genotip dağılımları nüks varlığına göre değerlendirildiğinde “istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır” ($p=0,048$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-2 Larinks Kanserli Hastaların karakteristik özelliklerine göre ve kontrol grubunda OX40 rs17568 genotip dağılımlarının incelenmesi

	OX40 rs17568 Genotip			p
	AA	GG	AG	
Hasta Grubu	42 (52,5%)	10 (12,5%)	28 (35%)	0,500
Kontrol Grubu	49 (44,1%)	18 (16,2%)	44 (39,6%)	
	A allel		G allel	p
Hasta Grubu	112(70%)		48(30%)	0,133
Kontrol Grubu	139 (62,6%)		83(37,4%)	
Hasta Grubu Histopatolojik	AA	GG	AG	P
Veriler				
Perinöral İnvazyon Var	9 (52,9%)	4 (23,5%)	4 (23,5%)	0,227
Perinöral İnvazyon Yok	29 (52,7%)	5 (9,1%)	21 (38,2%)	
T3-T4	30 (56,6%)	8 (15,1%)	15 (28,3%)	0,134
T1-T2	8 (42,1%)	1 (5,3%)	10 (52,6%)	
N1-N2-N3	21 (62,8%)	3 (8,8%)	10 (29,4%)	20,332
N0	17 (44,7%)	6 (15,8%)	15 (39,5%)	
Nüks pozitif	1 (12,5%)	2 (25%)	5 (62,5%)	0,048
Nüks negatif	41 (57,7%)	7 (9,9%)	23 (32,4%)	
Uzak Metastaz Varlığı	36 (51,4%)	9 (12,9%)	25(35,7%)	0,398
Negatif				
Uzak Metastaz Varlığı	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0,819
Pozitif				
Alkol kullanımı yok	17 (54,8%)	3 (9,7%)	11 (35,5%)	0,919
Alkol Kullanımı var	21 (51,2%)	6 (14,6%)	14 (34,1%)	
Reflü pozitif	17 (54,8%)	4 (12,9%)	10 (32,3%)	0,776
Reflü negatif	25 (51%)	6(12,2%)	18(36,7%)	
Ailede Kanser Hikayesi pozitif	12 (48%)	4(16%)	9(36%)	0,599
Ailede Kanser Hikayesi negatif	30 (54,5%)	6 (10,9%)	19 (34,5%)	
Farkhlaşma az	3 (42,9%)	2 (28,6%)	2 (28,6%)	0,226
Farkhlaşma iyi-orta	22 (50%)	6 (13,6%)	16 (36,4%)	
Sigara Kullanımı yok	21(58,3%)	2(5,6%)	13(36,1%)	0,226
Sigara Kullanımı var	21 (47,7%)	8(18,2%)	15 (34,1%)	

Hasta grubunun klinik parametreleri ayrıca OX40 rs17568 polimorfizmine ait allel taşıma durumları açısından da karşılaştırılmıştır (Tablo 4-3). Nüks pozitif olan hastalarda G alleli taşıma durumunun nüks olmayanlara göre “istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu” saptanmıştır ($p=0,023$; OR:9,567; %95CI -1,117-81,928) (Tablo 4-3). (Bu durum G alleli taşımanın nükse yatkınlık ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanabilir.) Hasta grubuna ait diğer klinik parametreler ve allel taşıma durumları “arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır” ($p>0,05$) (Tablo4-3).

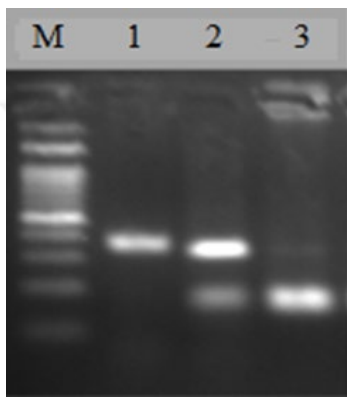
Tablo 4-3 Larinks Kanserli Hastaların karekteristik özelliklerine göre ve kontrol grubunda OX40 rs17568 allel taşıma durumlarının incelenmesi

OX40 rs17568	AAAG	GG	p	OR (95% CI)	GGAG	AA	p	OR (95% CI)	AAGG	AG	p	OR (95% CI)
Hasta Grubu	70 (87,5%)	10 (12,5%)	0,474	1,355 (0,589-3,116)	38 (47,5%)	42 (52,5%)	0,254	0,714 (0,402-1,273)	52 (65%)	28 (35%)	0,514	0,820 (0,452-1,489)
Kontrol Grubu	93 (83,8%)	18 (%16,2)			62 (55,9%)	49 (44,1%)			67 (60,4%)	44 (39,6%)		
Perinöral invazyon var	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,201	0,325 (0,076-1,385)	8 (47,1%)	9 (52,9%)	0,988	0,991 (0,333-2,948)	13 (76,5%)	4 (23,5%)	0,267	0,498 (0,143-1,731)
Perinöral invazyon yok	50 (90,9%)	5 (9,1%)			26 (47,3%)	29 (52,7%)			34 (61,8%)	21 (38,2%)		
T3-T4	45 (84,9%)	8 (15,1%)	0,429	0,313 (0,036-2,681)	23 (43,4%)	30 (56,6%)	0,277	0,558 (0,193-1,610)	38 (71,7%)	15 (28,3%)	0,56	0,355 (0,121-1,047)
T1- T2	18 (94,7%)	1 (5,3%)			11 (57,9%)	8 (42,1%)			9 (47,4%)	10 (52,6%)		
N1-N2-N3	31 (91,2%)	3 (8,8%)	0,485	1,938 (0,445-8,438)	13 (38,2%)	21 (61,8%)	0,148	0,501 (0,195-1,285)	24 (70,6%)	10 (29,4%)	0,371	0,639 (0,239-1,708)
N0	32 (84,2%)	6 (15,8%)			21 (55,3%)	17 (44,7%)			23 (60,5%)	15 (39,5%)		
Nüks pozitif	6 (75%)	2 (25%)	0,225	0,328 (0,55-1,946)	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0,023	9,567 (1,117-81,928)	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,124	3,478 (0,764-15,827)
Nüks negatif	64 (90,1%)	7 (9,9%)			30 (42,3%)	41 (57,7%)			48 (67,6%)	23 (32,4%)		
Farklılaşma kötü	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0,300	0,395 (0,065-2,516)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	1	0,333 (0,267-6,666)	2 (28,6%)	5 (71,4%)	1	0,7000 (0,122-4,033)
Farklılaşma iyi-orta	38 (86,4%)	6 (13,6%)			22 (50%)	22 (50%)			16 (36,4%)	28 (63,6%)		
Uzak Metastaz var	61 (87,1%)	9 (12,9%)	0,588	0,871 (0,796-0,953)	34 (48,6%)	36 (51,4%)	0,495	0,514 (0,410-0,646)	45 (64,3%)	25 (35,7%)	0,295	0,643 (0,540-0,766)
Uzak Metastaz yok	2 (100%)	0 (0%)			0(0,0%)	2 (100%)			2 (100%)	0 (0,0%)		
Alkol Kullanımı yok	28 (90,3%)	3 (9,7%)	0,723	1,600 (0,367-6,975)	14 (45,2%)	17 (54,8%)	0,761	0,865 (0,339-2,204)	20 (64,5%)	11 (35,5%)	0,906	1,061 (0,399-2,823)
Alkol Kullanımı var	35 (85,4%)	6 (14,6%)			20 (48,8%)	21 (51,2%)			27 (65,9%)	14 (34,1%)		
Reflü var	27 (87,1%)	4 (12,9%)	1	0,942 (0,243-3,646)	14 (45,2%)	17 (54,8%)	0,739	0,858 (0,348-2,115)	21 (67,7%)	10 (32,3%)	0,683	0,820 (0,317-2,123)
Reflü yok	43 (87,8%)	6 (12,2%)			24 (49%)	25 (51%)			31 (63,3%)	18 (36,7%)		
Ailede Kanser Hikayesi var	21 (84%)	4 (16%)	0,717	0,643 (0,164-2,516)	13 (52%)	12 (48%)	0,587	1,300 (0,504-3,352)	16 (64%)	9 (36%)	0,899	1,066 (0,397-2,862)

Ailede Kanser Hikayesi yok	49 (89,1%)	6 (10,9%)			25 (45,5%)	30 (54,5%)			36 (65,5%)	19 (34,5%)		
Sigara kullanımı yok	34 (94,4%)	2 (5,6%)	0,172	3,778 (0,748-19,067)	15 (41,7%)	21 (58,3%)	0,345	0,652 (0,268-1,585)	23 (63,9%)	13 (36,1%)	0,851	1,093 (0,434-2,749)
Sigara kullanımı var	36 (81,8%)	8 (18,2%)			23 (52,3%)	21 (47,7%)			29 (65,9%)	15 (34,1%)		

4.2.2. OX40L rs1234313 A/G Polimorfizmine Ait Bulgular

OX40L rs1234313 bölgesine ait Bmrl restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 4-2'de verilmiştir.



Bant Boyları	
PCR Ürünü	329bp
AA Genotipi	329bp (yabanil tip)
AG Genotipi	329bp+176bp+153bp (heterozigot)
GG Genotipi	176bp+153bp (mutant)

Şekil 4-2 OX40L rs1234313 bölgesi kesim ürünleri

M: DNA Ladder, 1: AA genotipi, 2: AG genotipi, 3: GG genotipi

Bölgeye ait genotip dağılımları hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı. İki grup arasındaki genotip dağılımı “anlamli derecede farklı bulundu” ($p=0,007$) (Tablo 4-4). Hasta grubunda OX40L rs1234313 genotip dağılımları ayrıca sigara kullanımı, alkol kullanımı, ailede kanser hikayesi, reflü varlığı, perinöral invazyon, tümör derecesi, nod metastaz durumu, uzak metastaz, farklılaşma derecesi ve nüks gelişmesi parametreleri ile beraber incelenmiş ve gruplara ait genotip dağılım frekansları Tablo 4-4'te verilmiştir.

Tablo 4-4 Larinks Kanserli Hastaların karakteristik özelliklerine göre ve kontrol grubunda OX40L rs1234313 genotip dağılımının incelenmesi

	OX40L rs1234313 Genotip			P
	AA	AG	GG	
Hasta Grubu	10 (12,5%)	39 (48,8%)	31 (38,8)	0,007
Kontrol Grubu	5 (4,5%)	78 (70,3%)	28 (25,2%)	
	A allel		G allel	0,858
Hasta Grubu	69 (38,8%)		109 (61,2%)	
Kontrol Grubu	88(39,6%)		134(60,4%)	P
	AA	AG	GG	
Perinöral İnvazyon Var	1 (5,9%)	9 (52,9%)	7 (41,2%)	0,727

Perinöral İnvazyon Yok	7 (12,7%)	26 (47,3%)	22 (40%)	
T3-T4	5 (9,4%)	23 (43,4%)	25 (47,2%)	0,135
T1-T2	3 (15,8%)	12 (63,2%)	4 (21,1%)	
N1-N2-N3	3 (8,8%)	16 (47,1%)	15 (44,1%)	0,752
N0	5 (13,2%)	19 (50%)	14 (36,8%)	
Nüks pozitif	2 (25%)	4 (50%)	2 (25%)	0,480
Nüks negatif	8 (11,3%)	35(49,3%)	28 (39,4%)	
Uzak Metastaz Varlığı Negatif	8 (11,4%)	33 (47,1%)	29 (41,4%)	0,337
Uzak Metastaz Varlığı Pozitif	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	
Alkol kullanımı yok	5 (16,1%)	15 (48,4%)	11(35,5%)	0,462
Alkol Kullanımı var	3 (7,3%)	20 (48,8%)	18 (43,9%)	
Reflü Pozitif	4 (12,9%)	15 (48,4%)	12 (38,7%)	0,996
Reflü Negatif	6 (12,2%)	24 (49%)	19 (38,8%)	
Ailede Kanser Hikayesi pozitif	2 (8%)	11 (44%)	12 (48%)	0,458
Ailede Kanser Hikayesi negatif	8 (14,5%)	28 (50,9%)	19 (34,5%)	
Farklılaşma az	0 (0%)	3 (42,9%)	4 (57,1%)	0,306
Farklılaşma iyi-orta	4 (9,1%)	27 (61,4%)	13 (29,5%)	
Sigara Kullanımı yok	6 (16,7%)	13 (36,1%)	17 (47,2%)	0,118
Sigara Kullanımı var	4 (9,1%)	26 (59,1%)	14 (31,8%)	

OX40L rs1234313'nin hasta grubunda AAGG (homozigot) olma durumu frekansı kontrol grubuna göre “istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuş olup”, fark “istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur” (p=0,004; OR:0,423; %95CI -0,233-0,769). OX40L rs1234313'nin kontrol grubunda A allel taşıma olma durumu frekansı hasta grubundakilerine göre “istatistiksel anlamlı olarak yüksek” ve fark “istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur” (p=0,046; OR:01,536; %95CI -1,007-2,344). Erken tümör evreli (T1-T2) olan hastalarda A allel taşıma olma durumu frekansı ileri tümör evreli (T3-T4) olanlara göre “istatistiksel anlamlı olarak yüksek” ve fark “istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur” (p=0,046; OR:0,299; %95CI -0,087-1,019) (Tablo 4-5).

Tablo 4-5 Larinks Kanserli Hastaların karakteristik özelliklerine göre ve kontrol grubunda OX40L rs1234313 allel dağılımının incelenmesi

OX40L rs1234313	AAAG	GG	P	OR	GGAG	AA	P	OR	AAGG	AG	P	OR
Hasta Grubu	49 (61,2%)	31 (38,8%)	0,046	1,536 (1,007-2,344)	71 (88,8%)	9 (11,2%)	0,078	0,372 (0,12-1,156)	40 (50%)	40 (50%)	0,004	0,423 (0,233-0,769)
Kontrol Grubu	83 (74,8%)	28 (25,2%)			106 (95,5%)	4 (4,5%)			33 (29,7%)	78 (70,3%)		
Perinöral invaziv var	10 (58,8%)	7 (41,2%)	0,931	0,952 (0,315-2,879)	16 (94,1%)	1 (5,9%)	0,671	2,333 (0,266-20,443)	8 (47,1%)	9 (52,9%)	0,683	1,255 (0,422-3,731)
Perinöral invaziv yok	33 (60%)	22 (40%)			48 (87,3%)	7 (12,7%)			29 (52,7%)	26 (47,3%)		
T3-T4	28 (52,8%)	25 (47,2%)	0,046	0,299 (0,087-1,019)	48 (90,6%)	5 (9,4%)	0,427	1,800 (0,386-8,389)	30 (56,6%)	23 (43,4%)	0,139	0,447 (0,152-1,315)
T1-T2	15 (78,9%)	4 (21,1%)			16 (84,2%)	3 (15,8%)			7 (36,8%)	12 (63,2%)		
N1-N2-N3	19 (55,9%)	15 (44,1%)	0,530	0,739 (0,287-1,901)	31 (91,2%)	3 (8,8%)	0,714	0,566 (0,345-7,108)	18 (52,9%)	16 (47,1%)	0,803	0,889 (0,352-2,244)
N0	24 (63,2%)	14 (36,8%)			33 (86,8%)	5 (13,2%)			19 (50%)	29 (50%)		
Nüks pozitif	6 (75%)	2 (25%)	0,703	1,953 (0,368-10,373)	6 (75%)	2 (25%)	0,225	0,328 (0,055-1,946)	4 (50%)	4 (50%)	1	0,972 (0,225-4,194)
Nüks	43	28			64	7			35	36		

negatif	(60,6%)	(39,4%)			(90,1%)	(9,9%)			(49,3%)	(50,7%)		
Farklılaşma az	3 (42,9%)	4 (57,1%)	0,203	0,315 (0,062-1,607)	7 (100%)	0 (0,0%)	1	1,100 (1,002-1,208)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	0,427	0,427 (0,094-2,375)
Farklılaşma iyi-orta	31 (70,5%)	13 (29,5%)			40 (90,9%)	4 (9,1%)			27 (62,4%)	17 (38,6%)		
Uzak Metastaz var	41 (58,6%)	29 (41,4%)	0,512	0,58 (0,481-0,713)	62 (88,6%)	8 (11,4%)	0,612	0,886 (0,814-0,963)	37 (52,9%)	33 (47,1%)	0,233	0,471 (0,368-0,604)
Uzak Metastaz yok	2 (100%)	0 (0,0%)			2 (100%)	0 (0,0%)			0 (0,0%)	2 (100%)		
Alkol Kullanımı yok	20 (64,5%)	11 (35,5%)	0,471	1,423 (0,545-3,717)	26 (83,9%)	5 (16,1%)	0,278	0,411 (0,090-1,869)	16 (51,6%)	15 (48,4%)	0,974	0,984 (0,387-2,503)
Alkol Kullanımı var	23 (56,1%)	18 (43,9%)			38 (92,7%)	3 (7,3%)			21 (51,6%)	20 (48,8%)		
Reflü var	19 (61,3%)	18 (43,9%)	0,995	1,003 (0,398-2,525)	27 (87,1%)	4 (12,9%)	0,729	0,767 (0,189-3,109)	16 (51,6%)	15 (48,4%)	0,818	0,900 (0,366-2,214)
Reflü yok	30 (61,2%)	12 (38,7%)			44 (89,8%)	5 (10,2%)			24 (49%)	25 (51%)		
Ailede Kanser Hikayesi var	13 (52%)	12 (48%)	0,252	0,572 (0,219-1,496)	23 (92%)	2 (8%)	0,712	1,677 (0,323-8,717)	13 (52%)	12 (48%)	0,809	0,890 (0,346-2,293)
Ailede Kanser Hikayesi yok	36 (65,5%)	19 (34,5%)			48 (87,3%)	7 (12,7%)			27 (49,1%)	28 (50,9%)		
Sigara Kullanımı yok	19 (52,8%)	17 (47,2%)	0,159	0,522 (0,210-1,298)	31 (86,1%)	5 (13,9%)	0,724	0,620 (0,154-2,504)	22 (61,1%)	14 (38,9%)	0,072	0,441 (0,179-1,084)
Sigara Kullanımı var	30 (68,2%)	14 (31,8%)			40 (90,9%)	4 (9,1%)			18 (40,9%)	26 (59,1%)		

Çalışmamız sonucunda “elde edilen genotip verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde”, rs17568 A/G polimorfizmlerinin genotiplerinin hem hasta ($\chi^2=0,0683$, $p=0,7937$) hem de kontrol gruplarda ($\chi^2=1,6733$, $p=0,1958$) “Hardy-Weinberg dengesinde” olduğunu ortaya konulmuştur. Benzer şekilde, rs1234314 A/G polimorfizminde genotipleri de hasta grubunda ($\chi^2=1,251$ $p=0,2633$) “Hardy-Weinberg dengesine uyarken” kontrol grubunda ($\chi^2=15,497$ $p=0,000083$) “Hardy-Weinberg dengesine” uymamaktadır.

4.2.3. İki Bölgenin Kombine Sonuçları

OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 bölgelerine ait genotipik kombinasyonların hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları incelendi. “İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır” ($p=0,089$) (Tablo 4-6).

Tablo 4-6 OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 Kombine Genotipleme Sonuçları

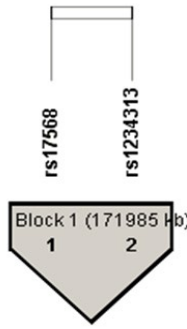
OX40/OX40L Genotip Kombinasyonları										
	AAAA	AAAG	AAGG	AGAA	AGAG	AGGG	GGAA	GGAG	GGGG	
Kontrol Grubu	4 (5%)	21 (26,2%)	17 (21,2%)	3 (3,8%)	16 (20%)	9 (11,2%)	2 (2,5%)	3 (3,8%)	5 (6,2%)	
Hasta Grubu	4 (3,6%)	31 (27,9%)	14 (12,6%)	1 (0,9%)	33 (29,7%)	10 (9%)	0 (0%)	14 (12,6%)	4 (3,6%)	

Genotipik kombinasyon dağılımları, istatistiksel değerlendirme amacıyla AAGG/diğer genotip kombinasyonları ve AGAG/diğer genotip kombinasyonları olarak gruplandırılmıştır. İki grupta sonucunda da “istatistiksel açıdan anlamlılığa yakın farklar” tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0,07$; $p=0,053$) (Tablo 4-7).

Tablo 4-7 OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 Hastalık Riskine yönelik Kombine Genotipleme Sonuçları

	AAGG	Diğer	P	OR (95% CI)
Hasta Grubu	18 (22,5%)	62 (77,5%)	0,071	2,012 (0,934-4,334)
Kontrol Grubu	14 (12,6%)	97 (87,4%)		
	AGAG	Diğer	P	OR (95% CI)
Hasta Grubu	14 (17,5%)	66 (82,5%)	0,053	0,501(0,248-1,016)
Kontrol Grubu	33 (29,7%)	78 (70,3%)		

4.3 Larinks Kanseri OX40 ve OX40L Polimorfizmlerine ait Haplotipleme Sonuçları



Tablo 4-8 rs17568 ve rs1234313 Polimorfizmlerine ait Haplotip Frekansları, Ki-kare (X²) ve p Değerleri

Blok	Frekanslar	Durum, Kontrol Oranı	Ki-kare	p-değer
haplotip frekansları				
AG	0,411	0,445, 0,386	1,303	0,25
AA	0,254	0,255, 0,253	0,002	0,96
GG	0,205	0,187, 0,217	0,535	0,46
GA	0,131	0,113, 0,143	0,726	0,39

Tabloda, OX40 ve OX40L SNP'leri için Bağlantı Dengesizliği (LD: Linkage disequilibrium) sonucu özetlenmektedir. Haplotip sırası, rs17568 ve rs1234313'dir.

“Tek nükleotid polimorfizmleri” arasındaki bağlantı dengesizliğinin (LD) hesaplanması ve haplotip bloklarının belirlenmesi için “Haploview 4,2 programı”

kullanılmıştır (Tablo 4-8). Rs17568 ve rs1234313 polimorfizmlerine ait AG, AA, GG ve GA haplotip frekansları Tablo 4-9'da gösterilmektedir. Haplotip analizi sonucunda larinks kanseri vakaları ile OX40 ve OX40L haplotip frekansları arasında “anlamli bir ilişki bulunamamıştır”. (HW p-değer farklılık:0,001, Minimum genotip %75, Minimum allel frekansı 0,001, r^2 eşik 0,8, LOD eşik 3,0).

Tablo 4-9 rs17568 ve rs1234313 arası Haplotip Değerlendirmesi

isim	Min. Allel	Durum, Kontrol Oranı	Ki-kare	p-değer
rs17568	A	0,700, 0,640	1,52	0,21
rs1234313	G	0,631, 0,604	0,3	0,58

Larinks kanser hastaları ve sağlıklı kontrollerde serum sOX40 ve sOX40L düzeyleri incelendi. “İstatistiksel olarak anlamli bir fark bulunmadığı belirlendi” ($p=0,984$ ve $p=0,776$) (Tablo 4-10).

Tablo 4-10 Larinks kanser hastaları ve sağlıklı kontrollerde serum sOX40 ve sOX40L düzeyleri

	Larinks Kanseri Hastaları	Sağlıklı Kontroller	P
	Ortalama±SE	Ortalama±SE	
Serum OX40 (pg/ml)	32,1661±1,6582	33,962±3,4134	0,984
Serum OX40L(pg/ml)	17,5712±4,784	31,7051±14,354	0,776

Larinks kanser hastalarının histopatolojik verilerine göre, OX40 serum düzeyi nüks pozitif olan hastalarda nüks olmayanlara göre “istatistiksel anlamli olarak yüksek bulunmuş” olup, fark “istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur” ($p=0,008$). Hasta ve kontrol grubu arasında OX40L düzeyleirn açısından “anlamli bir ilişkiye rastlanmamıştır”. Ayrıca larinks kanser hastalarında histopatolojik verilerine göre serum sOX40 ve sOX40L düzeyleri incelendiğinde ilgili diğer klinik ve histopatolojik verilerle “anlamli bir ilişki saptanmamıştır” (Tablo 4-11). “Hasta ve kontrol grubu arasında” sOX40 ve sOX40L serum düzeyleri, bu moleküllere ait incelenen genotiplerle bir ilişki göstermemiş olup, bu durum hastalıkla ilgili klinik ve patolojik parametrelerle de bağlantılı bulunmamıştır.

Tablo 4-11 Larinks kanser hastalarının histopatolojik verilerine göre serum sOX40 ve sOX40L düzeyleri

Parametreler		Ortalama	Standart Hata (SE)	P
Sigara Kullanımı				
OX40 (pg/ml)	Negatif	26,3502	2,01808	0,119
	Pozitif	33,3293	1,81955	
OX40L (pg/ml)	Negatif	-	-	
	Pozitif	17,5712	4,7849	
Alkol Kullanımı				
OX40 (pg/ml)	Negatif	33,70614	2,262979	0,562
	Pozitif	31,57632	2,543974	
OX40L (pg/ml)	Negatif	25,67250	7,582207	0,137
	Pozitif	11,09030	4,929849	
Uzak Metastaz Varlığı				
OX40 (pg/ml)	Negatif	33,20362	1,662200	0,082
	Pozitif	20,44830	-	
OX40L (pg/ml)	Negatif	17,57128	4,784932	
	Pozitif	-	-	
Ailede Kanser Hikayesi Varlığı				
OX40 (pg/ml)	Negatif	31,24995	1,932117	0,505
	Pozitif	33,60583	3,113267	
OX40L (pg/ml)	Negatif	18,77081	5,252349	0,515
	Negatif	7,97500	-	
Reflü varlığı				
OX40 (pg/ml)	Negatif	32,36240	2,250564	0,887
	Pozitif	31,85769	2,596788	
OX40L (pg/ml)	Negatif	23,60333	7,632275	0,409
	Pozitif	14,55525	6,151519	
Tümör Evresi				
OX40 (pg/ml)	t1 ve t2	31,43114	3,165766	0,594
	t3 ve t4	33,36190	1,822700	
OX40L (pg/ml)	t1 ve t2	32,06500	-	0,315
	t3 ve t4	15,75956	5,021658	
Lenf Nod Tutulumu				
OX40 (pg/ml)	n0	31,74284	2,309494	0,595
	n1, n2, n3	33,75583	2,669456	
OX40L (pg/ml)	n0	18,52230	5,882806	0,841
	n1, n2, n3	16,38250	8,879554	
Perinöral İnvazyon Varlığı				
OX40 (pg/ml)	Negatif	31,55977	2,114244	0,442
	Pozitif	34,59780	3,111324	
OX40L (pg/ml)	Negatif	16,83025	5,092606	0,843
	Pozitif	19,05333	11,976071	
Nüks				
OX40 (pg/ml)	Negatif	30,70895	1,491793	0,008
	Pozitif	43,82350	0,892500	
OX40L (pg/ml)	Negatif	18,65025	6,351215	0,773
	Pozitif	15,41333	8,340540	
Farklılaşma				
OX40 (pg/ml)	iyi orta	33,45103	1,795404	0,418
	kotu	27,45800	-	
OX40L (pg/ml)	iyi orta	17,57128	4,784932	
	kotu	-	-	

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde baş boyun bölgesinde en sık görülen kanserden biri olan larinks kanseri, diğer kanserlere nazaran “erken tanı ve yeterli tedavi” seçenekleri sağlandığında, tedaviye en iyi yanıt veren tümörler arasındadır (6,7). Ses kısıklığı baş göstermesi, glottik lezyonların erken bir semptomu olmasına rağmen, supraglottik tümörlerinin ileri evresidir. Daha sonraki aşamalarda, yabancı cisim hissi, disfaji ve öksürük yaygındır, ancak ses kısıklığı yalnızca glottis düzlemi işgal ederken ortaya çıkar. Subglottik tümörlerde ses telleri infiltridir (112,113).

"Alan kanserleşmesi" (field cancerization), baş boyun kanserini anlamak ve teşhis ve tedavi planını belirlemek için önemli bir kavramdır. Bu alandaki karsinogenez, geniş mukozal yüzeyde kanserojenlere (sigara içme gibi) uzun süre maruz kaldıktan sonra birçok bağımsız prekanseröz odak ve kanser odaklarının oluşması olarak tanımlanabilir (63).

Bu amaç doğrultusunda immünoterapi önemli bir fırsat niteliği taşımaktadır. Günümüzde geliştirilen immünterapatikler çeşitli kanserlerde önemli klinik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, henüz tam olarak nedeni aydınlatılmamakla birlikte çalışmalar bazı kanser çeşitlerinin immünoterapiye istenen yanıtı tam oluşturamadığı bildirilmiştir (114).

İmmünoterapiye direnç gösteren mekanizmalarının araştırılması sonucu, bu mekanizmanın daha iyi anlaşılmasına ve bu molekülerin ekspresyon dinamiğini hedef alan faktörlerin etkilerinin araştırılmasının bu açığı kapatılabileceği öngörülmektedir. “Tek nükleotit polimorfizm çalışmaları”, gen ekspresyonunu etkileyen mekanizmalardan biri olarak önem arz etmektedir. Bu amaç doğrultusunda genlerde kritik öneme sahip tek nükleotit polimorfizm çalışmaları mekanizmanın aydınlatılmasında anahtar rol oynayabilirler. Ayrıca son yıllarda immünterapi konusunda popüler olarak çalışılan immüne kontrol noktalarından PD-1 ve CTLA-4 yanı sıra, ko-aktivatör ve ko-inhibitör olarak görev yapan OX40, CD40, CD27 gibi diğer kontrol noktaları ve bu kontrol noktalarını etkileyen genlerin de “immün cevabın oluşturulmasında” önemli rol oynadıkları bilinmektedir (115). TNF süper ailesinin bir üyesi OX40 ve OX40'ın ligandı (OX40L) önemli ko-aktivatörlerdendir. 2007 yılında

Zaini ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları araştırmada TNF- α ile tetiklenen dendritik hücrelerin olgunlaşmasının, OX40L geninin artmış ifadesinin eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada OX40L ekspresyonunda herhangi artış olmadığına, dendritik hücrelerde görülen hücrel antitümör bağışıklık yanıtının oluşturulmadığını göstermişlerdir **(116)**.

“Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler)” ve “tek nükleotid mutasyonları”, yalnızca tek bir baz değişikliğinden kaynaklanır. SNP veya mutasyon, hastalığa yatkınlık, hastalığın patogenezi ve spesifik ilaçların etkinliği ile ilgili olabilir. SNP'leri veya mutasyonları klinik olarak tespit etmek önemlidir **(111)**.

Çalışmalar, OX40L polimorfizmlerinin çeşitli kanser tipleri haricinde sistemik sklerozdaki ateroskleroz, sistemik lupus eritematozus, miyokard enfarktüsü astım, Behçet hastalığı ve koroner kalp yetmezliği gibi diğer hastalıklarla da ilişkili olduğu belirtilmiştir. OX40 polimorfizmleri ise tip 2 diyabet, ateroskleroz, koroner kalp hastalıkları, akut koroner sendromu, miyokard enfarktüsü, baş-boyun kanserleri ve meme kanseri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir **(15,117,130)**.

OX40 rs17568 A/G değişimi, OX40 geninin ekson 5'inde yer alan eşanlamli olmayan bir SNP'dir. Adenin bazının Guanine dönüşmesi ile fonksiyonel sonucu olarak glutamin kodonunun bu amino asit için başka bir kodon ile değiştirilmesidir **(129,131)**. Rs17568 A/G mutasyonunun, OX40 genine ait ekspresyonun etkileyebileceğini öne sürülmektedir **(132,133,134)**. 2019 yılında Faghih ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada rs17568 bölgesinde GG genotipini taşıyan bireylerin burun ve paranazal sinüslerde skuamöz hücreli karsinom gelişim riskini 2 kattan fazla arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda OX40 rs17568 genotip dağılımları ve sağlıklı bireyler arasında genotip dağılımı ve allel frekansları açısından “anlamli bir fark saptanmamıştır”. Ayrıca ilgili OX40 rs17568 gen varyantlarının hastalardaki sigara kullanımı, alkol kullanımı, ailede kanser hikayesi, reflü varlığı, perinöral invazyon, tümör evresi, lenf nod metastaz durumu, uzak metastaz, farklılaşma derecesi parametreleri ile de bir “korelasyonu tespit edilmemiştir”. Ancak, OX40 rs17568 G allel taşıma frekansı nüks gösteren hastalarda, nüks göstermeyen hastalara göre “istatistiksel anlamli olarak yüksek olarak saptanmıştır”. Bu risk yaklaşık 9 katın da üzerinde olarak tespit edilmiştir. Faghih ve arkadaşlarının çalışması göz önüne alındığında riskin G allelinden çok GG genotipi üzerinde olduğu bildirilmiştir. Buna yönelik bizim

sonuçlarımız ise G allelinin risk üzerine etkisini oldukça dikkat çekici olarak sunmaktadır.

Literatürde kanser dışında farklı hastalıklarda OX40 ve OX40L SNP lerine yer vermiş olup, sonuçlar ilgi çekicidir. Buna göre, Chen ve arkadaşlarına G allelini miras alan taşıyıcıların “akut koroner sendromunun” geliştirmeye daha yatkın olduğunu bildirmişlerdir. Yaş, diyabet, hipertansiyon, cinsiyet ve lipid düzeyleri gibi faktörler eşlenik kabul edildiğinde G allelinin taşıyıcılarında akut koroner sendrom riskinin “önemli ölçüde artığı bildirilmiştir” (127). Daha sonra aynı ekip çalışmalarını genişleterek yine aynı hastalıkta Çin Han popülasyonda araştırılan aynı gen bölgesinin hastalık riski ile ilişkisi olmadığını bildirmiş olsa da, rs17568 A/G SNP'nin bu popülasyonda HDL-C'nin “(yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol)” serumdaki seviyesine etkili olduğunu bildirmişlerdir (133). Yine yapılan çalışmalarda rs17568 polimorfizminin serum HDL düzeylerini etkilediğini (118,131) ve bu bölgedeki “A alleli taşıyan bireylerin”, “G allelini bulunduran bireylere” göre daha yüksek LDL ve toplam kolesterol seviyelerine sahip olduğu rapor edilmektedir (134).

Çin toplumunda yapılan bir başka çalışma sonrasında, “aterosklerotik serebral enfarktüsü (ACI)” hastalar ve kontrol bireyleri arasında OX40 ve OX40L ait rs1234313, rs17568 ve rs1234314'in “allel ve genotip dağılımlarında değerlendirilmiş olup”, “anlamli bir farklılık bulunamamıştır”. Aynı çalışmada ACI ve karotis plağı olan “hastalar ile kontrol bireyleri” arasında da anlamli bir ilişki tespit edilememiştir (125). Chen ve arkadaşları, “koroner kalp hastaları” üzerinde yürüttükleri çalışma sonrasında, rs1234314 A/G dahil olduğu beş SNP değerlendirilmiş, hasta ve kontrol grubu arasında anlamli bir fark saptamamıştır (123). Yine Çin Han toplumunda yapılan bir diğer çalışmada ise Weiguang ve arkadaşları, OX40L'a ait rs1234314 dahil olduğu yedi SNP'yi (rs6661173, rs1234313, rs3850641, rs1234315, rs12039904, rs844648 ve rs10912580) meme kanseri “hastası ve sağlıklı bireyde” karşılaştırarak hastalıkla olası ilişkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda rs385064 rs844648 ve rs10912580 ile meme kanseri arasında “anlamli bir ilişki tespit etmişlerdir”. Çalışmamızda da araştırılan OX40L rs1234313 ile ilgili hasta ve kontrol ise “anlamli bir ilişki saptanmış olup”, hastalık riski GG genotipi “taşıma durumu ile ilişkili bulunmuştur”.

Tablo 5-1 Literatürdeki bazı hastalıklarda yapılan çalışmalarda bildirilen OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 genotiplerine ait populasyon dağılım verileri (146) ve bizim verilerimizin populasyonumuz üzerine dağılımı

	Populasyon	Hastalık	AA (%)	AG (%)	GG(%)	Kaynak
OX40 rs17568						
Chen 2008	Çin	Akut Koroner Sendrom	50,3	46,1	3,6	(148)
Chen 2011	Çin	Akut Koroner Sendrom	48,2	45,9	5,9	139
Huang 2014	Çin	Serebral Enfarktüs	48,9	39,7	11,4	137
Maalhigh 2015	İran	Miyokard Enfarktüsü	46,0	44,0	10,0	140
Bizim çalışmamız	Türkiye	Larinks Kanseri	44,1	39,6	16,2	
OX40L rs1234313						
Chen 2011	Çin	Koroner Arter Hastalığı	45,2	41,5	13,4	146
Cheng 2011	Çin	Koroner Arter Hastalığı	45,3	41,6	13,1	135
Huang 2014	Çin	Serebral Enfarktüs	43,9	44,7	11,4	137
Koch 2008	Alman	Miyokard Enfarktüsü	45,6	44,8	9,7	149
Bizim çalışmamız	Türkiye	Larinks Kanseri	4,5	70,3	25,2	

Tablo 5-1'de gösterilen bazı hastalıklarda yapılan çalışmalarda bildirilen OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 genotiplerine ait “populasyon dağılım verileri” “yüzde olarak gösterilmiştir”. Bu verilere göre bizim populasyonumuzun OX40 rs17568 AA(%44,1), AG (%39,6), GG (%16,2), verileri Çin-Han ve İran populasyonları için saptanan frekanslarla kısmi uyumlu iken, OX40L rs1234313 bizim populasyonumuza ait çalışmamızda verilerinde ise AA %4,5, AG %70,3 ve GG %25,2 olarak saptanmıştır. Populasyonunuz rs1234313 için bildirilen Çin ve Alman populasyonları ile farklılık göstermektedir.

“Küçük damar hastalığı (SVD)” ve “büyük arter ateroskleroza (LAA)” ile yapılan bir başka çalışmada rs1234313 SNP araştırmasında hasta ve kontrol bireyleri arasında “anlamlı bir korelasyona sahip olduğu” gözlemlenmiştir (135). Başka bir çalışmada ise rs1234313'in Behçet hastalığı ile arasında önemli ilişkisi olduğu ve bu hastalığa olan duyarlılıkta “kritik rol oynadığı öne sürülmüştür” (125). Lu ve ark. çalışmaları miyokardiyal enfarktüs hasta analiz sonuçlarına göre TNFSF4 geninin rs3850641 polimorfizminin A allel taşıyıcıları MI riskini artırdığını doğrulamıştır (16). Çalışmamızda OX40L rs1234313 için bulgularımız, larinks kanserli ve kontrol sağlıklı bireyler arasında “genotip ve allel dağılımlarında” farklılık saptanmıştır. Buna göre OX40L rs1234313 GG genotipi frekansı hasta grubunda kontrol grubuna göre “yaklaşık

1,5 kat yüksek bulunmuştur”. İlgili genotip için gen varyantlarının hastalardaki sigara, alkol kullanımı, ailede kanser reflü, tümör derecesi, perinöral invazyon, lenf nod metastazı, uzak metastaz, farklılaşma derecesi, nüks durumu parametreleri ile de bir korelasyonu tespit edilmemiştir. Genotipik kombinasyon dağılımları açısından incelendiğinde, AAGG kombine genotipi hastalık risk artışı, AGAG ise hastalığa karşı koruyucu olma açısından “istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bulunmuş” olması dikkat çekici bulgudur. OX40 ve OX40L düzeyleri ve ilgili genotip taşıma durumları ile beraber incelendiğinde ise hastalık riski veya progresyonu üzerinden herhangi bir ilişki tespit edilmemiştir.

Liu ve ark. 2013 yılında yaptığı bir çalışmada OX40L/OX40 sistemindeki genetik varyantları Çin hipertrigliseridemik (HTG) popülasyonunda araştırmış ve onların “plazma lipid ve lipoprotein düzeyleri” ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hastalarda rs17568 bölgesindeki G allel taşıyıcıları olan hasta bireyler daha yüksek serum “düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-C)” seviyelerine sahipken, kontroller daha düşük “serum toplam serum kolesterol” ve LDL-C seviyelerine sahiptir. Rs3850641 ve rs17568 polimorfizmleri OX40L'nin ve OX40 genleri, endojen HTG'li bireylerde ve/veya Han Çinlilerinin genel popülasyonunda bazı lipit ve lipoprotein varyasyonları ile ilişkilendirilmiştir (17).

Sonuç olarak;

Çalışmamız türk populasyonunda larinks kanserli hastalarda OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 ve ilgili serum düzeylerinin beraber çalışıldığı ve “hastalık klinik ve patolojik parametreleri” ile de beraber değerlendirildiği ilk çalışma olma niteliğindedir.

Çalışmamız türk populasyonunda ilk olarak OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 genotip frekanslarını tespit etmiştir.

Larinks kanser hastalarda kontrollere göre “anlamlı bir fark gözlenmez iken”, hastalar histopatolojik verilerine göre değerlendirildiklerinde, OX40 serum düzeyi nüks pozitif olan hastalarda nüks olmayanlara göre “istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuş” olup, fark “istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur”. OX40L için bu şekilde bir ilişki saptanmamıştır.

OX40 rs17568 genetik varyantları taşımanın “hastalık riski ile bir ilişkisi saptanmamış” olup, hasta grubunda G allel taşıma durumu nüks varlığı ile ilişki bulunmuştur.

Bulgularımız, OX40L rs1234313 genotip varyantlarını taşıma durumunun hastalık riski ile ilişkili olabileceği yönündedir. Buna göre, OX40L rs1234313 GG genotipi ile AA/GG homozigot genotip taşıma durumu hastalık riski ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca yine rs1234313 GG genotipi taşıma durumunun hastaların ileri tümör evresinde olma durumu ile ilişkili olabileceği görülmüştür.

Hasta grubunda OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 genotip dağılımları ve ilgili moleküllerin serum düzeyleri birarada değerlendirildiğinde sigara kullanımı, alkol kullanımı, ailede kanser hikayesi, reflü varlığı, perinöral invazyon, tümör derecesi, nod metastaz durumu, uzak metastaz, farklılaşma derecesi ve nüks gelişmesi parametreleri ile beraber incelenmiş ancak “anlamlı bir ilişki saptanmamıştır”.

Çalışılan OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 olmak üzere her iki genotip kombine genotip analizi ile birarada incelendiğinde, risk genotipi için aday AAGG ve risk azlığı için aday AGAG kombine genotipleri olarak görülmektedir.

Çalışmamızda larinks kanserli hastalarda incelenen OX40 rs17568 ve OX40L rs1234313 genotip dağılımları ve ilgili moleküllerin serum düzeylerinin daha yüksek sayıda “hasta ve kontrol popülasyonlarında” değerlendirilmesi sonucunda, elde ettiğimiz verilerden de yola çıkarak, hastalık etyopatogenezinin değerlendirilmesine yardımcı olacak verilerin elde edilebileceği kanaatindeyiz.

Limitasyonlar:

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol örnek sayılarının artırılması ve doku örneklerinden ilgili ekspresyon çalışmalarının da gerçekleştirilmesi, araştırmanın temel konusu olan OX40, OX40L gen varyantlarının ve sOX40L düzeylerinin larinks kanseri ile olan ilişkisinin daha net ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
2. Mills, S. E., Carter, D., Greenson, J. K., Reuter, V. E., and Stoler, M. H. (2012). *Sternberg's diagnostic surgical pathology*. Lippincott Williams ve Wilkins.
3. Lipkin, A., Miller, R. H., and Woodson, G. E. (1985). Squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, and larynx in young adults. *The Laryngoscope*, 95(7), 790-793.
4. Elci, O. C., Akpinar-Elci, M., Blair, A., and Dosemeci, M. (2003). Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. *Journal of occupational and environmental medicine*, 45(10), 1100-1106.
5. Haddad, R. I., and Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1143-1154.
6. Jang, S. J., Chiba, I., Hirai, A., Hong, W. K., and Mao, L. (2001). Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related?. *Oncogene*, 20(18), 2235-2242.
7. Braakhuis, B. J., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R., and Brakenhoff, R. H. (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer research*, 63(8), 1727-1730.
8. Gonzalez-Pons, M., and Cruz-Correa, M. (2015). Colorectal cancer biomarkers: where are we now?. *BioMed research international*, 2015.
9. Suzuki, H. I., Katsura, A., Matsuyama, H., and Miyazono, K. (2015). MicroRNA regulons in tumor microenvironment. *Oncogene*, 34(24), 3085-3094.
10. Yu, Y. R., and Ho, P. C. (2019). Sculpting tumor microenvironment with immune system: From immunometabolism to immunoediting. *Clinical and Experimental Immunology*, 197(2), 153-160.
11. Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Löhden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. (1995).

The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5), 793-802.

12. Bremer, E. (2013). Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

13. Müller, N., Wyzgol, A., Münkler, S., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2008). Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *The FEBS journal*, 275(9), 2296-2304.

14. Miller, J. E., Veturi, Y., and Ritchie, M. D. (2019). Innovative strategies for annotating the “relationSNP” between variants and molecular phenotypes. *BioData mining*, 12(1), 1-22.

15. Vakil Monfared, R., and Mashayekhi, F. (2018). OX40L gene polymorphism and breast cancer in Iranian population. *Experimental Oncology*.

16. Lu, C., Jia, H., and Xu, A. (2018). The rs3850641 polymorphism of the TNFSF4 gene increases the risk of myocardial infarction in a Chinese Han population. *Bioscience reports*, 38(4).

17. Liu, R., Qiao, Y., Liu, Y., Li, X., Chen, Y., Qiang, O., and Bai, H. (2013). Genetic variation in the OX40L/OX40 system and plasma lipid and lipoprotein levels in a Chinese hypertriglyceridemic population. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 17(3), 207-213.

18. Saran, M., Georgakopoulos, B., and Bordoni, B. (2019). *Anatomy, Head and Neck, Larynx Vocal Cords*.

19. Dr. Nermin Seda ILGAZ (Doktora Tezi) Tez Danışmanı Prof. Dr. Davut ALPTEKİN Hipoksi ve Embriyonik Kök Hücre Genlerinin Larinks Kanseri Patogenezindeki Rolü (Tıbbi Biyoloji Doktora Programı-2017)

20. Dr. Tülay Sayılğan (Uzmanlık Tezi) Klinik Şefi ve Tez Danışmanı: Dr. Deniz Özcan Larinks Skuamöz Hücreli Karsinomaunda Cox-2 Ekspresyonunun Önemi (Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Bölümü-2006)

21. Dr. Vefa Kınış Larinks Kanseri Tümör (T) Evrelemesinde Teşhis Yöntemlerinin Değerlendirilmesi ve Karşılaştırılması (Uzmanlık Tezi) İstanbul-2008

22. Dr. Öznur ÜNAL (Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı Doç. Dr. Burçe ÖZGEN MOCAN Larinks Kanserin Evrelemesinde Pre-Operatif BT ve Radyologdeneyiminin etkisi (T.C. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Ana Bilim Dalı-2014)
23. Zvrko, E., Gledović, Z., and Ljaljević, A. (2008). Risk factors for laryngeal cancer in Montenegro. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 59(1), 11-18.
24. Ferlito, A. (1993). The World Health Organization's Revised Classification of Tumours of the Larynx, Hypopharynx, and Trachea. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 102(9), 666-669.
25. Yılmaz, T., Hoşal, A. Ş., Gedikoğlu, G., and Kaya, S. (1999). Prognostic significance of histopathological parameters in cancer of the larynx. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 256(3), 139-144.
26. Ballenger, J. J., and Snow, J. B. (2003). *Ballenger's otorhinolaryngology: head and neck surgery*. Pmph-usa.
27. Haddad, R. I., and Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1143-1154.
28. Jin, C., Jin, Y., Wennerberg, J., Åkervall, J., Dictor, M., and Mertens, F. (2002). Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer genetics and cytogenetics*, 132(2), 85-96.
29. Choi, H. R., Sturgis, E. M., Rosenthal, D. I., Luna, M. A., Batsakis, J. G., and El-Naggar, A. K. (2003). Sarcomatoid carcinoma of the head and neck: molecular evidence for evolution and progression from conventional squamous cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology*, 27(9), 1216-1220.
30. Dr. Emrah Gülmez (Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı: Prof. Dr. İmdat Yüce Kanser Kök Hücre Belirteci Olan CD133 Ekspresyonunun Larinks Kanserlerinde Radyoterapi Cevabındaki Rolü (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı-2019)
31. Shanmugaratnam, K., and Sobin, L. H. (1993). The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer*, 71(8), 2689-2697.

32. Hellquist, H., Cardesa, A., Gale, N., Kambic, V., and Michaels, L. (1999). Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. *Histopathology*, 34(3), 226-233.
33. Gale, N., Kambic, V., Michaels, L., Cardesa, A., Hellquist, H., Zidar, N., and Poljak, M. (2000). The Ljubljana classification: a practical strategy for the diagnosis of laryngeal precancerous lesions. *Advances in anatomic pathology*, 7(4), 240-251.
34. Licitra, L., Bernier, J., Grandi, C., Locati, L., Merlano, M., Gatta, G., and Lefebvre, J. L. (2003). Cancer of the larynx. *Critical reviews in oncology/hematology*, 47(1), 65-80.
35. Salvador-Coloma, C., and Cohen, E. (2016). Multidisciplinary care of laryngeal cancer. *Journal of oncology practice*, 12(8), 717-724.
36. Elci, O. C., Akpınar-Elci, M., Blair, A., and Dosemeci, M. (2003). Risk of laryngeal cancer by occupational chemical exposure in Turkey. *Journal of occupational and environmental medicine*, 45(10), 1100-1106.
37. Haddad, R. I., and Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1143-1154.
38. Menvielle, G., Luce, D., Goldberg, P., Bugel, I., and Leclerc, A. (2004). Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *European Journal of Cancer Prevention*, 13(3), 165-172.
39. Tomek, M. S., and McGuirt, W. F. (2003). Second head and neck cancers and tobacco usage. *American journal of otolaryngology*, 24(1), 24-27.
40. Dr. Evren Ay ÖĞREDİK (Uzmanlık Tezi) Baki DENKBAŞ Larenks Kanseri Nedeniyle Opere Edilen Hastalarda Tümörün Lokal Yayılımı İle Boyun Metastazı Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi (Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi I.Kulak Burun Boğaz Kliniği-2009)
41. Hobbs, C. G., and Birchall, M. A. (2004). Human papillomavirus infection in the etiology of laryngeal carcinoma. *Current opinion in otolaryngology and head and neck surgery*, 12(2), 88-92.

42. Berkower, A. S., and Biller, H. F. (1988). Head and neck cancer associated with Bloom's syndrome. *The Laryngoscope*, 98(7), 746-748.
43. Gallus, S., Bosetti, C., Franceschi, S., Levi, F., Negri, E., and La Vecchia, C. (2003). Laryngeal cancer in women: tobacco, alcohol, nutritional, and hormonal factors. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 12(6), 514-517.
44. Wünsch, V. (2004). The epidemiology of laryngeal cancer in Brazil. *São Paulo Medical Journal*, 122(5), 188-194.
45. Almadori, G., Cadoni, G., Cattani, P., Galli, J., Bussu, F., Ferrandina, G., Scambia, G., Fadda, G. and Maurizi, M. (2001). Human papillomavirus infection and epidermal growth factor receptor expression in primary laryngeal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research*, 7(12), 3988-3993.
46. Ferlito, A., Rinaldo, A., and Marioni, G. (1999). Laryngeal malignant neoplasms in children and adolescents. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 49(1), 1-14.
47. Gao, X., Fisher, S. G., Mohideen, N., and Emami, B. (2003). Second primary cancers in patients with laryngeal cancer: a population-based study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 56(2), 427-435.
48. Dr. Ayhan Umay (Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hüseyin Özdemir Larinks Kanseri Tanısında Diffüzyon MR'ın Tanıya Katkısı (Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı-2011)
49. Tatar, G., Cermik, T. F., Karagoz, Y., Gundogan, C., Karacetin, D., Yildiz, E., and Yigit, O. (2018). The value of whole-body contrast-enhanced 18F-FDG PET/CT imaging in the diagnosis and staging of patients with laryngeal carcinoma. *Nuclear medicine communications*, 39(4), 334-342.
50. Dr. Serdal Çitil (Tıpta Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Öztürk Larinks Kansерlerinde, Sınırlı BT Bulgularının Dinamik Kontrastlı MR ve PET BT İle Karşılaştırılması ve Histopatolojik Korelasyonu (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı-2012)
51. Dr. Deniz Kanlıada (Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı Prof. Dr. Engin Yazıcıoğlu RRM1 ve p53R2 DNA Tamir Genleri Varyantlarının Baş-Boyun Kansерleri İle

İlişkisinin Araştırılması (T.C İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı-2012)

52. Kaanders, J. H., and Hordijk, G. J. (2002). Carcinoma of the larynx: the Dutch national guideline for diagnostics, treatment, supportive care and rehabilitation. *Radiotherapy and Oncology*, 63(3), 299-307.

53. Ünverdi, Ö. F., and Demir, A. (2019). Baş Boyun Kanseri Evrelemesine Güncel Bir Bakış: Geçmiş Kriterlerin Güncel Kriterlerle Karşılaştırmalı Analizi. A Perspective on Head and Neck Cancer Staging: Comparative Analysis of Past Criteria with Updated Criteria. *Kocaeli Tıp Dergisi*, 8(1), 67-73.

54. Yousem, D. M., Gad, K., and Tufano, R. P. (2006). Resectability issues with head and neck cancer. *American Journal of Neuroradiology*, 27(10), 2024-2036.

55. Becker, M. (1998). Larynx and hypopharynx. *Radiologic Clinics of North America*, 36(5), 891-920.

56. Becker, M., Burkhardt, K., Dulguerov, P., and Allal, A. (2008). Imaging of the larynx and hypopharynx. *European journal of radiology*, 66(3), 460-479.

57. Hermans, R. (2006). Head and neck cancer: how imaging predicts treatment outcome. *Cancer Imaging*, 6 (Spec No A), S145.

58. Reimer, P., Parizel, P. M., Meaney, J. F., and Stichnoth, F. A. (Eds.). (2010). *Clinical MR imaging*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

59. Connor, S. (2007). Laryngeal cancer: how does the radiologist help?. *Cancer imaging*, 7(1), 93.

60. Dr. Abdullah DEMİRKAN (Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kayhan ÖZTÜRK Baş Boyun Kanserlerinde 18 FDG PET/BT'nin İlk Evreleme ve Yeniden Evrelemedeki Rolü (Meram Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı-2011)

61. Tatar, G., Cermik, T. F., Karagoz, Y., Gundogan, C., Karacetin, D., Yildiz, E., and Yigit, O. (2018). The value of whole-body contrast-enhanced 18F-FDG PET/CT imaging in the diagnosis and staging of patients with laryngeal carcinoma. *Nuclear medicine communications*, 39(4), 334-342.

62. Chawla, S., and Carney, A. S. (2009). Organ preservation surgery for laryngeal cancer. *Head and Neck Oncology*, 1(1), 1-12.
63. Braakhuis, B. J., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R., and Brakenhoff, R. H. (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer research*, 63(8), 1727-1730.
64. Sattler, S. (2017). The role of the immune system beyond the fight against infection. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, 3-14.
65. De Visser, K. E., Eichten, A., and Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews cancer*, 6(1), 24-37.
66. Colombo, M. P. (2017). On OX40 and PD-1 combination: why should OX40 be first in sequence?. *Clinical Cancer Research*, 23(20), 5999-6001.
67. Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L. C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K. And Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3580-3589.
68. Webb, G. J., Hirschfield, G. M., and Lane, P. J. (2016). OX40, OX40L and autoimmunity: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy and immunology*, 50(3), 312-332.
69. Klinger, M., Kim, J. K., Chmura, S. A., Barczak, A., Erle, D. J., and Killeen, N. (2009). Thymic OX40 expression discriminates cells undergoing strong responses to selection ligands. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4581-4589.
70. Vogel, K. U., Edelmann, S. L., Jeltsch, K. M., Bertossi, A., Heger, K., Heinz, G. A., Zöller, J., Warth, S. C., Hoefig, K. S., LOHS, C., eff, F., Kremmer, E., Schick, J., Repsilber, D., Geerlof, A., Blum, H., Wurst, W., Heikenwälder, M., Schmidt-Supprian, M. and Heissmeyer, V. (2013). Roquin paralogs 1 and 2 redundantly repress the Icos and Ox40 costimulator mRNAs and control follicular helper T cell differentiation. *Immunity*, 38(4), 655-668.
71. Endl, J., Rosinger, S., Schwarz, B., Friedrich, S. O., Rothe, G., Karges, W., Schlosser, M., Eiermann, T., Schendel, D. J. and Boehm, B. O. (2006). Coexpression of CD25 and OX40 (CD134) receptors delineates autoreactive T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*, 55(1), 50-60.

72. Wilde, B., Dolff, S., Cai, X., Specker, C., Becker, J., Tötsch, M., Costabel, U., Dürig, J., Kribben, A., Willem, J., Tervaert, C., Schmid, K.W. and Witzke, O. (2009). CD4⁺ CD25⁺ T-cell populations expressing CD134 and GITR are associated with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(1), 161-171.
73. Freier, V. (2000). The expression of OX40 in immunologically mediated diseases of the gastrointestinal tract (celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis). *European journal of clinical investigation*, 30(7), 594-599.
74. Giacomelli, R., Passacantando, A., Perricone, R., Parzanese, I., Rascente, M., Minisola, G., and Tonietti, G. (2001). T lymphocytes in the synovial fluid of patients with active rheumatoid arthritis display CD134-OX40 surface antigen. *Clinical and experimental rheumatology*, 19(3), 317-320.
75. Aten, J. A. N., Roos, A., Claessen, N., Schilder-Tol, E. J., TEN BERGE, I. J., and Weening, J. J. (2000). Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(8), 1426-1438.
76. Zhou, Y. B., Ye, R. G., Li, Y. J., and Xie, C. M. (2009). Targeting the CD134–CD134L interaction using anti-CD134 and/or rhCD134 fusion protein as a possible strategy to prevent lupus nephritis. *Rheumatology international*, 29(4), 417-425.
77. Börnsen, L., Christensen, J. R., Ratzer, R., Oturai, A. B., Sørensen, P. S., Søndergaard, H. B., and Sellebjerg, F. (2012). Effect of natalizumab on circulating CD4⁺ T-cells in multiple sclerosis. *PloS one*, 7(11), e47578.
78. Xiaoyan, Z., Pirskanen, R., Malmstrom, V., and Lefvert, A. K. (2006). Expression of OX40 (CD134) on CD4⁺ T-cells from patients with myasthenia gravis. *Clinical and Experimental Immunology*, 143(1), 110-116.
79. Szypowska, A., Stelmazczyk-Emmel, A., Demkow, U., and Łuczyński, W. (2014). High expression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) molecules on CD4⁺ CD25^{high} cells in children with type 1 diabetes. *Advances in medical sciences*, 59(1), 39-43.
80. Łuczyński, W., Stasiak-Barmuta, A., Juchniewicz, A., Wawrusiewicz-Kurylonek, N., Ilendo, E., Kos, J., Kretowski, A., Górka, M., Chyczewski, L. and Bossowski, A. (2010). The mRNA expression of pro-and anti-inflammatory cytokines in T regulatory

cells in children with type 1 diabetes. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48(1), 93-100.

81. Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M. S. (2017). OX40: Structure and function—What questions remain?. *Molecular immunology*, 83, 13-22.

82. Zhang, N., Li, G., Xiao, B., Liu, Y., Cai, Y., Sun, X., and Liang, J. (2010). Dynamic change OX40/OX40L mRNA in experimental allergic neuritis. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical Sciences*, 35(9), 964-968.

83. Boot, E. P., Koning, G. A., Storm, G., Wagenaar-Hilbers, J. P., van Eden, W., Everse, L. A., and Wauben, M. H. (2005). CD134 as target for specific drug delivery to auto-aggressive CD4⁺ T cells in adjuvant arthritis. *Arthritis research and therapy*, 7(3), 1-12.

84. Kim, M. Y., Toellner, K. M., White, A., McConnell, F. M., Gaspal, F. M., Parnell, S. M., Jenkinson, E., Anderson, G. and Lane, P. J. (2006). Neonatal and adult CD4⁺ CD3[−] cells share similar gene expression profile, and neonatal cells up-regulate OX40 ligand in response to TL1A (TNFSF15). *The Journal of Immunology*, 177(5), 3074-3081.

85. Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2006). OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *The Journal of Immunology*, 176(10), 5975-5987.

86. Mendel, I., and Shevach, E. M. (2006). Activated T cells express the OX40 ligand: requirements for induction and costimulatory function. *Immunology*, 117(2), 196-204.

87. Wang, Q., Chen, Y., Xie, F., Ge, Y., Chen, L., Wu, H., Qu, Q., Wang, X. and Zhang, X. (2006). Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble OX40L (CD252) in human sera of different ages or with Graves' disease. *Cytokine*, 36(1-2), 23-28.

88. Rajabi, P., Alaei, M., Mousavizadeh, K., and Samadikuchaksaraei, A. (2012). Altered expression of TNFSF4 and TRAF2 mRNAs in peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus: association with atherosclerotic symptoms and lupus nephritis. *Inflammation research*, 61(12), 1347-1354.

89. Pakala, S. V., Bansal-Pakala, P., Halteman, B. S., and Croft, M. (2004). Prevention of diabetes in NOD mice at a late stage by targeting OX40/OX40 ligand interactions. *European journal of immunology*, 34(11), 3039-3046.
90. Malmström, V., Shipton, D., Singh, B., Al-Shamkhani, A., Puklavec, M. J., Barclay, A. N., and Powrie, F. (2001). CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *The Journal of Immunology*, 166(11), 6972-6981.
91. Godfrey, W. R., Fagnoni, F. F., Harara, M. A., Buck, D., and Engleman, E. G. (1994). Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4⁺ T cells with homology to tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine*, 180(2), 757-762.
92. Ruby, C. E., Yates, M. A., Hirschhorn-Cymerman, D., Chlebeck, P., Wolchok, J. D., Houghton, A. N., Offner, H. and Weinberg, A. D. (2009). Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *The Journal of Immunology*, 183(8), 4853-4857.
93. Xiao, X., Gong, W., Demirci, G., Liu, W., Spoerl, S., Chu, X., Bishop, D.K., A. Turka, L. and Li, X. C. (2012). New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo. *The Journal of Immunology*, 188(2), 892-901.
94. Piconese, S., Valzasina, B., and Colombo, M. P. (2008). OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *The Journal of experimental medicine*, 205(4), 825-839.
95. Prell, R. A., Evans, D. E., Thalhoffer, C., Shi, T., Funatake, C., and Weinberg, A. D. (2003). OX40-mediated memory T cell generation is TNF receptor-associated factor 2 dependent. *The Journal of Immunology*, 171(11), 5997-6005.
96. Vu, M. D., Clarkson, M. R., Yagita, H., Turka, L. A., Sayegh, M. H., and Li, X. C. (2006). Critical, but conditional, role of OX40 in memory T cell-mediated rejection. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1394-1401.
97. Kopf, M., Ruedl, C., Schmitz, N., Gallimore, A., Lefrang, K., Ecabert, B., Odermatt, B. and Bachmann, M. F. (1999). OX40-deficient mice are defective in Th cell proliferation but are competent in generating B cell and CTL responses after virus infection. *Immunity*, 11(6), 699-708.

98. Kinnear, G., Wood, K. J., Marshall, D., and Jones, N. D. (2010). Anti-OX40 prevents effector T-cell accumulation and CD8⁺ T-cell mediated skin allograft rejection. *Transplantation*, 90(12), 1265-1271.
99. Imura, A., Hori, T., Imada, K., Ishikawa, T., Tanaka, Y., Maeda, M., Imamura, S. and Uchiyama, T. (1996). The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *The Journal of experimental medicine*, 183(5), 2185-2195.
100. Mahmud, S. A., Manlove, L. S., Schmitz, H. M., Xing, Y., Wang, Y., Owen, D. L., Schenkel, J. M., Boomer, J. S., Green, J. M., Yagita, H., Chi, D. L., Hogquist, K. A. and Farrar, M. A. (2014). Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nature immunology*, 15(5), 473-481.
101. Vu, M. D., Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killeen, N., Ishii, N. and Chang Li, X. (2007). OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs. *Blood*, *The Journal of the American Society of Hematology*, 110(7), 2501-2510.
102. Ruby, C. E., Yates, M. A., Hirschhorn-Cymerman, D., Chlebeck, P., Wolchok, J. D., Houghton, A. N., Offner, H. and Weinberg, A. D. (2009). Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *The Journal of Immunology*, 183(8), 4853-4857.
103. Piconese, S., Pittoni, P., Burocchi, A., Gorzanelli, A., Carè, A., Tripodo, C., and Colombo, M. P. (2010). A non-redundant role for OX40 in the competitive fitness of Treg in response to IL-2. *European journal of immunology*, 40(10), 2902-2913.
104. Lu, Y., Zhang, M., Wang, S., Hong, B., Wang, Z., Li, H., Zheng, Y., Yang, J., Davis, R. E., Qian, J., Hou, J. and Yi, Q. (2014). p38 MAPK-inhibited dendritic cells induce superior antitumour immune responses and overcome regulatory T-cell-mediated immunosuppression. *Nature communications*, 5(1), 1-14.
105. Watts, T. H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 23, 23-68.
106. Walker, L. S. (2004). CD4⁺ CD25⁺ Treg: divide and rule?. *Immunology*, 111(2), 129-137.

107. Takeda, I., Ine, S., Killeen, N., Ndhlovu, L. C., Murata, K., Satomi, S., Sugamura, K. and Ishii, N. (2004). Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3580-3589.
108. Piconese, S., Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Tripodo, C., Rossi, M., Guglielmo, N., Mennini, G., Grazi, G. L., Filippo, S. D., Brozzetti, S., Fazzi, K., Antonelli, G., Lozzi, M. A. and Barnaba, V. (2014). Human OX40 tunes the function of regulatory T cells in tumor and nontumor areas of hepatitis C virus–infected liver tissue. *Hepatology*, 60(5), 1494-1507.
109. Voo, K. S., Bover, L., Harline, M. L., Vien, L. T., Facchinetti, V., Arima, K., Kwak, L. W. and Liu, Y. J. (2013). Antibodies targeting human OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. *The Journal of Immunology*, 191(7), 3641-3650.
110. Albert, P. R. (2011). What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. *Journal of psychiatry and neuroscience: JPN*, 36(6), 363.
111. Matsuda, K. (2017). PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: Real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement. *Advances in clinical chemistry*, 80, 45-72.
112. Suh, Y., Amelio, I., Urbano, T. G., and Tavassoli, M. (2014). Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell death ve disease*, 5(1), e1018-e1018.
113. Licitra, L., Bernier, J., Grandi, C., Locati, L., Merlano, M., Gatta, G., and Lefebvre, J. L. (2003). Cancer of the larynx. *Critical reviews in oncology/hematology*, 47(1), 65-80.
114. Crispen, P. L., and Kusmartsev, S. (2020). Mechanisms of immune evasion in bladder cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(1), 3-14.
115. Deng, J., Zhao, S., Zhang, X., Jia, K., Wang, H., Zhou, C., ve He, Y. (2019). OX40 (CD134) and OX40 ligand, important immune checkpoints in cancer. *OncoTargets and therapy*, 12, 7347.
116. Zaini, J., Andarini, S., Tahara, M., Saijo, Y., Ishii, N., Kawakami, K., Taniguchi, M., Sugamura, K., Nukiwa, T. ve Kikuchi, T. (2007). OX40 ligand expressed by DCs

costimulates NKT and CD4⁺ Th cell antitumor immunity in mice. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), 3330-3338.

117. Weiguang, Y., Dalin, L., Lidan, X., Yonggang, C., Shuang, C., Yanhong, L., Fengyan, X., Zhenkun, F., Da, P. ve Dianjun, L. (2012). Association of OX40L polymorphisms with sporadic breast cancer in northeast Chinese Han population.

118. Wang, X., Ria, M., Kelmenson, P. M., Eriksson, P., Higgins, D. C., Samnegård, A., Petros, C., Rollins, J., Bennet, A. M., Wiman, B., Faire, U., Wennberg, C., Olsson, P. G., Ishii, N., Sugamura, K., Hamsten, A., Forsman-Semb, K. and Paigen, B. (2005). Positional identification of TNFSF4, encoding OX40 ligand, as a gene that influences atherosclerosis susceptibility. *Nature genetics*, 37(4), 365-372.

119. Graham, D. S. C., Graham, R. R., Manku, H., Wong, A. K., Whittaker, J. C., Gaffney, P. M., Moser, K. L., Rioux, J. D., Altshuler, D., Behrens, T.W. ve Vyse, T. J. (2008). Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nature genetics*, 40(1), 83-89.

120. Gupta, V., Kumar, S., Pratap, A., Singh, R., Kumari, R., Kumar, S., Aggarwal, A. ve Misra, R. (2018). Association of ITGAM, TNFSF4, TNFAIP3 and STAT4 gene polymorphisms with risk of systemic lupus erythematosus in a North Indian population. *Lupus*, 27(12), 1973-1979.

121. Bunyavanich, S., Melen, E., Wilk, J. B., Granada, M., Soto-Quiros, M. E., Avila, L., Lasky-Su, J., Hunninghake, G. M., Wickman, M., Pershagen, G., O'Connor, G. T., Weiss, S. T. and Celedón, J. C. (2011). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is associated with allergic rhinitis in children with asthma. *Clinical and molecular allergy*, 9(1), 1-10.

122. Jiang, Y., Cheng, L., Li, X., Zhou, W., and Zhang, L. (2017). Associations between TNFSF4, TNFSF8 and TNFSF15 and Behçet's disease but not VKH syndrome in Han Chinese. *Oncotarget*, 8(62), 105037.

123. Cheng, G., Wang, H., Chen, M., Li, L., Gong, Y., and Liu, Q. (2011). Lack of evidence to support the association of polymorphisms within the TNFSF4 gene and coronary heart disease in a Chinese Han population. *Experimental and therapeutic medicine*, 2(2), 275-280.

124. Erfanian, S., RAHMANIAN, F., JAHROMI, A. S., and HOJJAT-FARSANGI, M. (2020). Non-association between rs17568 OX40 Gene Polymorphism and Type-2 Diabetes Mellitus, West-south of Iran. *Journal of International Translational Medicine*, 8(1), 19-22.
125. Huang, Q., Yang, Q. D., Tan, X. L., Feng, J., Tang, T., Xia, J., Zhang, L., Huang, L., Bai, Y. P. and Liu, Y. H. (2014). Absence of association between atherosclerotic cerebral infarction and TNFSF4/TNFRSF4 single nucleotide polymorphisms rs1234313, rs1234314 and rs17568 in a Chinese population. *Journal of International Medical Research*, 42(2), 436-443.
126. Lu, J. S., Wang, H., Yuan, F. F., Wu, L. L., Wang, B., and Ye, D. Q. (2018). Lack of association of tumor necrosis factor superfamily member 4 (TNFSF4) gene polymorphisms (rs3850641 and rs17568) with coronary heart disease and stroke: A systematic review and meta-analysis. *Anatolian journal of cardiology*, 19(2), 86.
127. Chen, Y., Zhang, L., Huang, H., Liu, R., Li, X., Qiang, O., and Zeng, Z. (2011). Association of OX40 and OX40L gene polymorphisms with acute coronary syndrome in a Han Chinese population. *DNA and cell biology*, 30(8), 597-602.
128. Maalhash, M., Shojaei, M., Erfanian, S., Jahromi, A. S., Sanie, M. S., Yusefi, A., Zabetian, H., Hakimelahi, H., Madani, A. and Hojjat-Farsangi, M. (2016). Lack of association between rs17568 polymorphism in OX40 gene and myocardial infarction, Southern of Iran. *Global journal of health science*, 8(6), 41.
129. Faghih, Z., Abtahi, S., Khademi, B., Nikfarjam, F., and Erfani, N. (2019). Association of OX40 gene polymorphisms (rs17568G/A and rs229811A/C) with head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular biology reports*, 46(3), 2609-2616.
130. Faghih, Z., Taherifard, E., Daneshmand, A., Talei, A., and Erfani, N. (2021). OX40 genetic variations in patients with breast cancer: a case-control study. *British Journal of Biomedical Science*, 78(1), 44-46.
131. Ria, M., Eriksson, P., Boquist, S., Ericsson, C. G., Hamsten, A., and Lagercrantz, J. (2006). Human genetic evidence that OX40 is implicated in myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications*, 339(3), 1001-1006.
132. Souza, H. S., Elia, C. C. S., Spencer, J., and MacDonald, T. T. (1999). Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 and OX40/OX40

ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 45(6), 856-863.

133. Olofsson, P. S., Söderström, L. A., Wågsäter, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., Hedin, U., Paulsson-Berne, G., Sirsjö, A. and Hansson, G. K. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(10), 1292-130114.

134. Yoshioka, T., Nakajima, A., Akiba, H., Ishiwata, T., Asano, G., Yoshino, S. I., Yagita, H. and Okumura, K. (2000). Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *European journal of immunology*, 30(10), 2815-283.

135. Jiang, Y., Liu, X., Du, Y., and Zhou, S. (2019). rs1234313 and rs45454293 are risk factors of cerebral arterial thrombosis, large artery atherosclerosis, and carotid plaque in the Han Chinese population: a case-control study. *BMC neurology*, 19(1), 1-10.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

LARİNKS KANSERİNDE OX40, OX40L GEN VARYANTLARININ VE SOX40L DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 8	% 2	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	% 4
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 3
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
6	www.docstoc.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	kbb-forum.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	yildontanju.tr.gg İnternet Kaynağı	<% 1
9	acikerisim.kirklareli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1