

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BAŞ VE BOYUN YASSI EPİTEL
HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA
SİKLOOKSİJENAZ-2, 12-LİPOKSİJENAZ VE
İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ GENLERİNİN
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Fatih ÇELENK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmet BAYRAMOĞLU**

ANKARA-2008

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KULAK BURUN BOĞAZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BAŞ VE BOYUN YASSI EPİTEL
HÜCRELİ KARSİNOMLARINDA
SİKLOOKSİJENAZ-2, 12-LİPOKSİJENAZ VE
İNDÜKLENEBİLİR NİTRİK OKSİT SENTAZ GENLERİNİN
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Fatih ÇELENK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmet BAYRAMOĞLU**

ANKARA–2008

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2007-63 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Değerli bilgi ve tecrübeleriyle uzmanlık eğitimimde büyük katkıları olan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr Suat ÖZBİLEN'e, Prof. Dr.Erdogan İNAL'a, Prof. Dr. Nebil GÖKSU'ya, Prof. Dr Fikret İLERİ'ye, Prof. Dr Ahmet KÖYBAŞIOĞLU'na, Prof. Dr İsmet BAYRAMOĞLU'na, Prof. Dr Yusuf KEMALOĞLU'na, Prof. Dr Sabri USLU'ya, Prof. Dr. Kemal UYGUR'a, Prof. Dr Yıldırım BAYAZİT'e, Doç. Dr Metin YILMAZ'a, Doç. Dr. Alper CEYLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin laboratuvar çalışması bölümünde büyük yardımları olan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda görevli Araş. Gör. Akın YILMAZ'a ve Araş. Gör. Volkan ERGİN'e, tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve her konuda bana destek olan eşim Nazlı ÇELENK'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİLLER ve RESİMLER	V
TABLolar	VI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Baş Boyun Bölgesinin İlgili Anatomisi	3
2.1.1. Larenks Anatomisi	3
2.1.2. Oral Kavitenin Anatomisi	4
2.1.3. Dudak Anatomisi	5
2.1.4. Orofarenksin Anatomisi	5
2.1.5. Hipofarenksin Anatomisi	6
2.2. Kanser	7
2.3. Baş Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi	8
2.4. Baş boyun kanserlerinde Etiyoloji ve Risk Faktörleri	10
2.4.1. Tütün kullanımı	11
2.4.2. Alkol Kullanımı	12
2.4.3. Virüsler	13
2.4.4. Diyet	14
2.4.5. Kanser Etiyolojisinde Genetik Yatkınlık	16
2.4.5.1. Mutajen Duyarlılığı	16
2.4.5.2. DNA Tamir Kapasitesi	17
2.4.5.3. Metabolik Enzim Polimorfizmleri	18
2.4.5.4. Kansere Yatkınlık Oluşturan Genler	19

2.4.6. Diğer Etiyolojik Faktörler	19
2.5. Baş Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi ve Karsinogenez	21
2.5.1. Protoonkogenler	22
2.5.2. Onkogenler	22
2.5.3. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG)	24
2.5.3.1. p53	24
2.5.3.2. p16	25
2.6. İnflamasyon	26
2.7. Siklooksijenazlar, Lipoksijenazlar ve Nitrik Oksit Sentaz	27
2.7.1. Siklooksijenazlar	27
2.7.1.1. Siklooksijenaz-2 (COX-2, PGHS-2)	29
2.7.2. Araşidonat Lipoksijenazlar	31
2.7.2.1. Araşidonat 12-Lipoksijenaz (ALOX12, 12-LOX)	33
2.7.3. Nitrik Oksit	35
2.7.3.1. Nitrik Oksit Biyosentezi ve iNOS	36
2.7.4. Araşidonik Asit Metabolitleri, Nitrik Oksit (NO) ve İnflamasyon	38
2.8. İnflamasyon ve Kanser	39
2.9. COX-2 ve Kanser	41
2.9.1. COX'un Karsinogenezdeki Rolü için Preklinik Kanıtlar	41
2.9.2. COX-2'nin Karsinogenezdeki Rolünün Mekanizmaları	42
2.9.2.1. Ksenobiyotik Metabolizma	42
2.9.2.2. Apoptosis	43
2.9.2.3. İnflamasyon ve İmmüsupresyon	43
2.9.2.4. Anjiojenez	44
2.9.2.5. İnvazyon ve Metastaz	44
2.10. ALOX-12 ve Kanser	45

2.11. iNOS ve Kanser	47
2.11.1. NO ve p53	48
2.11.2. NO-İlişkili DNA Hasarı	49
2.12. Real-Time Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. Araç ve Gereçler	53
3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Gereçler	53
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	54
3.1.3. Kullanılan Kitler	54
3.2. Yöntemler	55
3.2.1. Hastalar ve Örnekler	55
3.2.2. Kanser Dokusundan Total RNA Saflaştırılması	55
3.2.3. cDNA Sentez Tepkimesi	57
3.2.3.1. RT-PCR Programı	58
3.2.4. COX-2, ALOX12 ve iNOS Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Real-time PCR ile Değerlendirilmesi	58
3.2.4.1. COX-2 Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi	60
3.2.4.2. ALOX12 Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi	61
3.2.4.3. iNOS Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi	62
3.2.4.4. HPRT Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi	63
3.2.4.5. COX-2, ALOX12, iNOS ve HPRT Light-Cycler Deney Program	64
4. BULGULAR	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
6. ÖZET	80
7. SUMMARY	83
8. KAYNAKLAR	86

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Şekil 1.	Siklooksijenaz ve izomerazlar aracılığı ile prostanoidlerin sentezi	31
Şekil 2.	ALOX izoformları tarafından AA'nın dönüştürüldüğü metabolitler	33
Şekil 3.	COX-2 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	60
Şekil 4.	ALOX12 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	61
Şekil 5.	iNOS mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	62
Şekil 6.	HPRT mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	63
Şekil 7.	HPRT geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi	67
Şekil 8.	COX-2 geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi	67
Şekil 9.	ALOX12 geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi	68
Şekil 10.	iNOS geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi	68
Şekil 11.	Baş boyun kanseri ve sağlıklı kontrol dokularındaki COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri	69
Şekil 12.	Larenks kanseri ve sağlıklı kontrol dokularındaki COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri	70
Resim 1.	Real-time PCR tepkimesi için kullanılan LC cihazı	59

TABLÖLAR

Tablo 1. RT-PCR tepkime karışımı	57
Tablo 2. RT-PCR tepkime programı	58
Tablo 3. COX-2 Real-time PCR tepkime karışımı	60
Tablo 4. ALOX12 Real-time PCR tepkime karışımı	61
Tablo 5. iNOS Real-time PCR tepkime karışımı	62
Tablo 6. HPRT Real-time PCR tepkime karışımı	63
Tablo 7. Baş boyun kanseri ve sağlıklı kontrol dokusunda araştırılan genlerin ekspresyon seviyesine ilişkin istatistiksel veri	70
Tablo 8. Baş boyun kanseri ve sağlıklı kontrol dokusunda araştırılan genlerin ekspresyon seviyesine ilişkin istatistiksel veri	71

SEMBOLLER, KISALTMALAR

COX	: Siklooksijenaz
PGHS	: Prostaglandin G/H Sentaz
LOX	: Lipoksijenaz
ALOX	: Araşidonat Lipoksijenaz
iNOS	: İndüklenabilir Nitrik Oksit Sentaz
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
HPRT	: Hipoksantin Fosforiboziltransferaz
AA	: Araşidonik Asit
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PG	: Prostaglandin
PGG₂	: Prostaglandin G ₂
PGH₂	: Prostaglandin H ₂
PGE₂	: Prostaglandin E ₂
PI₂	: Prostaglandin I ₂ – Prostasiklin
TxA₂	: Tromboksan A ₂
HPETE	: Hidroperoksieikosatetraenoik Asit
HETE	: Hidroksieikosatetraenoik Asit
cysLT	: Sisteinil Lökotrien
LTB₄	: Lökotrien B ₄
LTC₄	: Lökotrien C ₄
NSAİİ	: Steroid Olmayan Anti-inflamatuvar İlaçlar
NO	: Nitrik Oksit
NF-κB	: Nükleer Faktör-kappa B
sGC	: Çözünebilir Guanilat Siklaz
GTP	: Guanozin Trifosfat
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
Ca²⁺	: Kalsiyum
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-α

GM-CSF	: Granulosit/Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
ICAM-1	: İntersellüler Hücre Adezyon Molekülü-1
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
ECGF	: Endotel Hücresi Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
LPS	: Bakteriyel Lipopolisakkarit
dNTP	: Deoksinükleozidtrifosfat
mRNA	: Elçi RNA
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HPV	: Human papilloma virüs
EBV	: Epstein Barr virüs
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
Rpm	: Dakika başına dönme sayısı
°C	: Derece Santigrad
dH₂O	: Distile Su
dk	: Dakika
sn	: Saniye
Kb	: Kilobaz
kDa	: KiloDalton
g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
M	: Molar
µM	: Mikromolar
pmol	: Pikomol
nm	: Nanometre
α	: Alfa
β	: Beta

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Baş boyun kanserlerinin oluşma mekanizması pek çok faktörün dinamik etkileşimi sonucu gelişen karmaşık bir süreçtir. Baş boyun kanserli olguların %90'ında bilinen karsinojenlere maruziyet mevcuttur. Bu karsinojenlerin başında tütün ve alkol bulunmaktadır. Herşeye rağmen baş boyun kanseri olgularının %5-10'unun etiyolojisini bilinen risk faktörleri açıklayamamaktadır.

İnflamasyon doku hasarlarına veya enfeksiyonlara karşı oluşturulan lokalize koruyucu reaksiyonlar olarak bilinmesine rağmen, çeşitli kanser türlerinin de dahil olduğu bir çok hastalıkta rolü olduğuna inanılmaktadır. Akut inflamasyon savunma cevabının bir parçası iken, kronik inflamasyon kansere, diyabete, kardiyovasküler, pulmoner ve nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir. Birçok proinflamatuvar gen ürününün apoptozisin baskılanmasında, proliferasyonda, angiogeneziste, invazyonda ve metastazda kritik roller üstlendikleri tanımlanmıştır.

Siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) genleri ile çeşitli araşidonat lipoksijenaz (ALOX) genleri inflamasyon sürecine etkileri bakımından önemli roller üstlenirler. COX-2 ve ALOX enzimleri 20 C'lu bir yağ asiti olan araşidonik asiti, inflamasyonun gelişim sürecine katkıda bulunan çeşitli biyoaktif metabolitlere dönüştürürler. Ayrıca iNOS ve dolayısıyla ürünü olan nitrik oksit inflamasyonun bazı aşamalarında etkindir.

Çalışmamızın amacı çeşitli inflamatuvar hastalıklarda etkileri kanıtlanmış olan COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin, baş boyun yassı epitel hücreli

karsinomlardaki ekspresyon düzeylerinin ve karsinogenezdeki potansiyel rollerinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BAŞ BOYUN BÖLGESİNİN İLGİLİ ANATOMİSİ

2.1.1. Larenks Anatomisi

Larenks hava yollarının korunması, respirasyon ve fonasyon gibi görevleri olan, boyunda orta hatta dil köküyle trakea arasında yer alan, kıkırdak iskelet üzerine membranlar, ligamanlar ve kasların yerleşmesiyle oluşmuş bir organdır. Embriyolojik olarak intrauterin hayatın dördüncü ve onuncu haftaları arasında gelişmeye başlar. 4. ve 5. brankiyal arklardan gelişir. Doğumda C3-C4 vertebra lar arasındayken erişkin erkekte C3–7, kadında C3–6 vertebra lar arasına yerleşir.¹ Boyutu yaşa ve cinsiyete göre değişkenlik gösteren birbirine ligaman ve membranlarla bağlı mobil bir organdır.² Larenksin iskelet çatısı hyoid kemik ve kıkırdaklar tarafından oluşturulur. Larenksin kıkırdakları tek olarak tiroid, krikoid ve epiglot ve çift olarak da aritenoid, kuneiform ve kornikulat kıkırdakları içerir. Larenksin membranlarını tirohyoid, kuandrangüler ve krikovokal membranlar (konus elastikus) oluşturur. Larenks, farenksle ilişkili olan larengeal girişten trakea ile devam eden krikoid kıkırdak alt kenarına kadar devam eder. Vokal kordlar larenksi supraglottik, glottik ve subglottik bölgeler olmak üzere üç bölgeye ayırır.³

2.1.2. Oral Kavitenin Anatomisi

Oral kavite, deri-vermilyon birleşim hattından başlayıp üstte sert damağın ve yumuşak damağın birleşme noktasına, altta sirkümvallat papillalara kadar

uzanan bölgedir. Dudakları, bukkal mukozayı, üst ve alt alveolar sırtı, retromolar üçgeni, dilin ön üçte ikisini (oral dil), ağız tabanını ve sert damağı içine alır.

Sert damak anterior nazal çatıyı oral kaviteden ayırır ve ağzın tavanını oluşturur. Sert damağın mukozası ve periostu birbirine sıkıca yapışmıştır.

Retromolar üçgen, tabanı son molar dişin distal yüzeyinden posterior mandibular alveol boyunca uzanan, apeksi maksiller kabartıda bulunan bir üçgensel bölgedir. Üçgenin lateral sınırı oblik olarak superior ve laterale doğru koronoid çıkıntıya uzanır. Medyal bacağı anterior tonsil plikası ile birleşir. Buradaki mukoza mandibulanın çıkan koluna sıkıca yapıştığı için kanserler sıklıkla mandibulayı invaze ederler.

Sulkus terminalis dili üçte ikisi önde ve üçte biri arkada kalacak şekilde ikiye ayırır. Ön (hareketli) dil oral kavitenin, arka üçte bir (kök) orofarinksin bir parçasıdır. Dilin eksternal kasları üç çift kas grubundan oluşur; hiyoglossus, stiloglossus, genioglossus. Bu kaslar iç kaslarla birlikte çalışarak artikülasyona ve yutmaya yardımcı olurlar. Dilin büyük kısmını transvers ve vertikal kas grupları oluşturur.

Ağız tabanı mandibular alveol ve dil arasına yerleşmiştir. Arkada anterior tonsil plikasına uzanır. Ağız tabanı lingual frenulumun her iki yanındaki Wharton kanalı (submandibuler bez) ağzı tarafından delinir. Sublingual bez çifti mandibula ile hiyoglossus kasları arasında milohiyoid kası üzerine otururlar.

2.1.3. Dudak Anatomisi

Dudaklar oral kavitenin ön sınırını oluşturur. Üst ve alt dudaklar birleşerek mobil bir sfinkter oluştururlar ve bu şekilde ağızdaki sıvıların dışarı dökülmesini önleyip, çiğneme, yutma ve artikülasyonda önemli rol oynarlar. Dudaklar aynı zamanda görünüm ve yüz anlatımını sağlayarak da estetik yönden önemlidir. Dudaklarda mukozanın bitip yüz derisinin başladığı hat olan vermilyon üst dudakta daha uzundur.

Orbikularis oris kası dudak içinde yer alan ve oral kaviteyi çevreleyen bir sfinkter gibi görev görür. Üst dudakta bu kas nerdeyse kolumellaya kadar çıkar ve anterior nazal spine yapışır. Aşağıda ise mental kas ile karışarak çene kıvrımını oluşturur. Bu kasın lateral derin yüzeyine birçok fasiyal mimik kas yapışır ve bu kaslar oral kompetans ile çok çeşitli dudak hareketlerinin yapımını sağlar. Orbikularis oris kasının derin kısmını altında birçok minör tükrük bezi olan gevşek ağız mukozası kaplar.

2.1.4. Orofarenksin Anatomisi

Orofarenks, nazofarenksi ve oral kaviteyi hipofarenkse bağlayan farenksin orta kısmıdır. Sert damak seviyesinden hiyoid seviyesine kadar uzanır. Anteriorda oral kaviteye açılır ve ön sınırını sirkumvallat papilla, anterior tonsil plikaları ve sert damak-yumuşak damak bileşkesi oluşturur. Orofarenks klinik olarak orofarenks lateral duvarı veya tonsil bölgesi, posterior duvar, dil kökü ve yumuşak damak bölümlerine ayrılır.

Palatin tonsil, tonsil fossasına yerleşmiştir ve varsa tonsilin derinine inen kör epitel tübüllerinden oluşan kriptlerle dolu düzensiz yüzeye sahiptir. Yumuşak damak posteriora ve aşağıya doğru orofarenkse uzanan fibromuskuler yapıdır. Tensor veli palatini, levatör veli palatini, uvula kasları ve palatofarengeal kaslar tarafından oluşmuştur. Dil kökü orofarenksin anteriorunda yer alır ve sirkumvallat papilladan farengoepiglottik ve glossoepiglottik kıvrımlara kadar uzanır. Lingual tonsiller her iki tarafın da lateralinde yüzeyel olarak uzanır ve mukoza yüzeyinin düzensiz olmasına neden olur.

Orofarenks üç taraftan potansiyel fasyal boşluklarla çevrilmiştir. Retrofarengeal boşluk, farenksin bukkofarengeal fasyası ile prevertebral fasyanın alar tabakası arasında uzanan gevşek bağ dokusu bölgesidir. Kafa tabanından superior mediastene kadar uzanır ve lateralde parafarengeal boşlukla ilişkilidir. Parafarengeal boşluk kafa tabanından hiyoid kemiğin büyük boynuzuna kadar uzanan fasyal planlar tarafından oluşturulur ve farengeal duvarların lateralinde bulunur.

2.1.5. Hipofarenksin Anatomisi

Hipofarenks hiyoid kemik seviyesinden krikoid kırığının alt sınırına kadar uzanır. Üstte orofarenks, altta ösofagus ile devamlılık gösterir. Üç alt birime ayrılır: lateralde piriform sinüsler, posteriorda farengeal duvar, anteriorda postkrikoid bölge. Piriform sinüs superiorda faringoepiglottik kıvrımdan inferiorda gerçek vokal kord seviyesine uzanır. Lateral sınırlarını tiroid kırık ve tirohiyoid membran oluşturur. Medyal sınırlarını larenks oluşturur. Postkrikoid

bölge aritenoidlerin posterior yüzünden krikoid kıkırdağın inferior kenarına doğru tümseklik yapar ve hipofarenksin anterior sınırını oluşturur.

2.2. Kanser

Yaşam, doğma, büyüme ve ölüm olarak tanımlanan bir dögüdür. Organizma yaşam döngüsüne dahil olduktan sonra, hücrelerin düzenli ve kontrollü bir biçimde çoğalma süreci büyüme olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçte ortaya çıkabilecek bazı düzensizlikler, kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olabilmekte ve organizmadaki bu kontrolsüz çoğalma süreci, fizyolojik bozukluklar olarak tanımlanan tümörlerin oluşumuna sebep olmaktadır.

“Neoplazi”nin sözcük anlamı “yeni büyüme”dir. Willis, neoplazmi “normal dokuyu aşan ve onunla koordine olmayan, değişime yol açan uyarı durduktan sonra bile aynı şekilde aşırı büyümeye devam eden anormal doku kitlesi” olarak tanımlar.⁴ Esas olarak bütün neoplazmların kökeni normal büyüme kontrollerine cevabın kaybıdır.

Bir tümörün mikroskopik ve makroskopik özellikleri ile nispeten sessiz kabul edildiğinde, yani lokalize kalacağı, diğer bölgelere yayılmayacağı ve bu nedenle lokal cerrahi çıkarılma ile hastanın sağ kalacağı düşünülürse “benign” olduğu söylenir. Malign tümörler topluca kanser olarak adlandırılır. Latince “yengeç” kelimesinden gelir-vücudun herhangi bir parçasına yengeç gibi inatçı bir şekilde yapışır. “Malign” olarak değerlendirilen neoplazm, komşu yapılara yayılan, onları harap eden ve uzak bölgelere yayılarak (metastaz) ölüme yol açan lezyondur.⁴

Kanser, hücrenin hücre siklusundaki düzenleyici kontrolü kaybetmesiyle ve çevreden gelen sinyallerden bağımsız çoğalma kabiliyeti kazanmasıyla gelişmektedir. 1950'lerin ortalarında hücresel fonksiyonu kontrol eden ve bilgi akışını sağlayan unsurların DNA ve RNA ile ilgili olarak genler olduğu keşfedildi. Kanser hücrelerinde gelişen kalıcı ve kalıtsal nitelikteki değişikliklerinde genlerle ilgili olduğu anlaşıldı. Mutajen olabileceği düşünülen pek çok karsinojen ajan ve metaboliti keşfedildi. Kanser gelişimi ile ilgili çalışmalar kanserin çok basamaklı bir süreç olduğunu gösterdi.⁵

Hücre kontrolünün bozulması süreci kanser cinslerine göre değişkenlik göstermekle birlikte ortalama 15- 20 yıldır. Dünyadaki en karmaşık hastalıklardan biri olan kanserin iki yüzden fazla çeşidi olduğu belirtilmektedir. Kanserler köken aldıkları doku ve organlara göre isimlendirilirler. Belirti, bulgu ve tedavileri de kanserin cinsine göre değişmektedir. Kanser hücrelerinin normal hücreler kadar güçlü bağların olmadığı tespit edilmiştir. Bu, kanser hücrelerinin diğer hücrelerden ayrılmasına, kan ve lenfatik sistem yoluyla vücudun başka bölgelerine yayılmasına sebep olur ve bu duruma metastaz adı verilir. Anormal biçimde çoğalan ve yayılan bu hücreler bulundukları yerdeki doku ve organları işgal ederek bu bölgelerin görevlerini engellerler.

2.3. Baş Boyun Kanserlerinin Epidemiyolojisi

Oral kavite, tükürük bezleri, paranazal sinüsler, nazal kavite, orofarenks, nazofarenks, hipofarenks ve larenksteki kanserler topluca baş boyun kanserleri olarak adlandırılmaktadır. Baş boyun kanserlerinin %90'ı üst solunum yolu ve üst

sindirim yolu mukozasındaki yassı epitelden kaynaklanır. Bu yüzden baş boyun kanserleri ifadesinden genellikle baş boyun yassı epitel hücreli kanserleri anlaşılmaktadır. Bu bölgedeki diğer organlardan tiroid ve tükürük bezleri, kemik, kıkırdak, kas, sinir ve yumuşak dokulardan kaynaklanan tümörler %5–15 oranında görülür.^{6,7} Larenks kanserleri baş boyun kanserlerinin en sık görülenidir. Tüm kanserlerin %2'sini oluşturur.^{8,9}

Baş boyun kanseri tüm kanser olgularının %6'sını oluşturur. Dünya çapında yılda 650000 yeni baş boyun kanseri olgusu ve baş boyun kanseri nedeniyle 350000 ölüm görülmektedir.¹⁰ Baş boyun kanserleri dünya çapında beşinci en sık kanser tipi ve kanserle ilişkili ölüm sebebidir.¹¹ En yüksek insidans gelişmekte olan ülkelerde mevcuttur.¹² Her yüz bin kişiden baş boyun kanserlerine yakalanma oranı ABD'de 10, İngiltere'de 4, İskandinav ülkelerinde 1, Batı Avrupa ve Güney Amerika ülkelerinde ise 15–20 kişidir.^{6,13} 2003 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) baş-boyun kanserlerine ait 37.000 yeni vaka ve 12.000 adet ölüm gerçekleşmiştir.¹⁴ 2007 yılında ABD'de baş boyun kanserlerinde tahmini 45660 yeni olgu ve 11210 ölüm olmuştur.¹⁵

Baş boyun kanserlerinin insidansı yaş ile artmaktadır. Avrupa'da hastaların %98'i 40 yaş üzerindedir.¹⁶ Tanı için medyan yaşı 60'tır.^{10,17} Bununla birlikte baş boyun kanserlerinin insidansı genç erişkinlerde artmaktadır.^{18,19} Geçtiğimiz iki dekatta baş boyun kanserinin insidansında hafif bir azalma saptanırken¹⁷ dil kökü ve tonsil kanseri insidansında artış belirtilmiştir.

Erkeklerle kıyasla baş boyun kanserleri kadınlarda daha nadirdir. ABD'de erkeklerdeki kanserlerin %8,5'ini, kadınlardaki kanserlerin ise %3,2'sini baş

boyun kanserleri oluşturmaktadır.²⁰ Erkek kadın oranı genel olarak 1.5:1'dir.²¹ Özellikle gelişmiş ülkelerde erkekler kadınlardan daha fazla etkilenmektedir ve bu oran 10:1'e kadar çıkmaktadır.²² Anatomik bölgeye göre de erkek kadın oranı değişmektedir. Örneğin Avrupa'da farengeal kanser olgularının %85'inden fazlası ve larengeal kanserlerin %92'sinden fazlası erkeklerde olmaktadır.²³ Baş boyun kanserleri için 5 yıllık sağ kalım oranı %64'tür. En yüksek sağ kalım oranı %91 ile dudak kanseridir. En düşük sağ kalım oranı %31 ile hipofarenks kanseridir.²¹

Baş-boyun kanserlerinin anatomik lokalizasyonları da çeşitli ülkelere göre değişkenlik gösterir. Fransa'da hipofarenks kanserleri, İtalya ve İspanya'da supraglottik kanserler daha çok izlenir.¹³ Çin'de baş boyun kanserleri tüm kanserlerin yaklaşık %45'ini oluşturmaktadır. Baş-boyun kanserlerinin farklı coğrafik bölgelerde ve ülkelerde değişik oranlarda görülmesi; ırkların genetik özellikleri, çevre kirliliği, beslenme alışkanlıkları, hijyen, alkol ve tütün alışkanlığı gibi çeşitli faktörlere bağlanabilir.

2.4. Baş boyun kanserlerinde Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Baş boyun kanserlerinin oluşma mekanizması pek çok faktörün dinamik etkileşimi sonucu gelişen kompleks bir süreçtir. Baş boyun kanserli olguların %90'ında bilinen karsinogenlere maruziyet mevcuttur. Bu karsinogenlerin başında tütün bulunmaktadır. Alkol tütün kullanımının karsinogen etkisini arttıran en önemli faktördür. Diğer önemli etiyolojik faktörler ise virüsler, genetik yatkınlık, hava kirliliği, radyasyon maruziyeti ve diyetir.^{20,24,25}

2.4.1. Tütün kullanımı

Tütün baş boyun bölgesindeki kanserlerin çoğunda risk faktörüdür: oral kavite, farenks, larenks, özefagus. Avrupa Birliği'nde oral kanserlerin erkeklerde %60'ı kadınlarda %30'u sadece sigara kullanımına bağlı olduğu tespit edilmiştir. ²³ Tütün üretimi ve tütünün işlenmesi aşamalarında kullanılan katkı maddeleriyle birlikte sigarada 4000'den fazla bileşik olduğu saptanmıştır. Deneysel çalışmalarda bu bileşiklerden en az 70'inin karsinojen etkisinin olduğu gösterilmiştir. ²⁶ Bu karsinojenler arasında polisiklik hidrokarbonlar, heterosiklik aromatik hidrokarbonlar, aldehitler, N-nitrozaminler yer alır. ¹¹ Siyah ve sarı tütünde konsantrasyonları farklı olduğu için (siyah tütünde yüksek seviyede N-nitrozamin ve aromatik aminler bulunur) baş boyun kanseri gelişme riski tüketime bağlıdır. Mevcut çalışmalarda siyah tütünle ilişkili faringeal, larengeal ve ösofageal kanser riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Sigaranın günlük içme miktarı ve içme süresi kanser gelişiminde önemlidir. Katranın yanması ile açığa çıkan metilkolantren, benzopiren ve benzantrasen gibi maddeler DNA'ya bağlanarak hasara neden olurlar. ²⁷

Uzun süre sigara içilmesi mukozalarda morfolojik değişikliklere neden olur. Sigara içme durdurulursa bu değişiklikler geri dönebilir. Yapılan bir çalışmada oral kavite kanseri teşhisi konmuş hastalardan sigara kullanmaya devam edenlerde mukozal irritasyon sürdüğü için %40 oranında sekonder üst solunum ve sindirim yolu malignitesi, ancak sigara kullanmayı bırakanlarda %6 oranında sekonder malignensi geliştiği rapor edilmiştir. ²⁸

Oral kavite kanserindeki risk tütün kullanımının miktarı ve süresi ile artmaktadır. Bir çalışmada sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında günde 1-5 sigara içen erkeklerde 4.8 ve 11 veya daha fazla sigara içenlerde 8.1 rölatif risk tespit edilmiştir.²⁹ Aynı çalışmada 10 yıl veya daha fazla sigara kullanan erkekler günde 11-20 sigara içenlerdeki 7.3'lük rölatif risk 30 veya daha fazla sigara içenlerde 16.5'e yükselmiştir. Alkol kullanmayan ve günde 40 veya daha fazla sigara kullananlarda oral ve farengeal kanser için rölatif risk 3.7 iken aynı miktarda sigara kullanan ve belli miktarda günlük alkol kullananlarda 6.4 olarak tespit edilmiş. Rothman ve ark.³⁰ içilen sigara miktarı ile larengeal kanser arasında lineer pozitif ilişki bulmuşlardır.

2.4.2. Alkol Kullanımı

Sigara baş boyun kanseri oluşumunda majör risk faktörü olmakla birlikte ABD'de baş boyun kanserli olguların %75'inde alkol kullanımının da olduğu bildirilmiştir.^{31,32} Üst hava-sindirim yolu kanser riski alkol kullananlarda sigara kullanımı kontrol edildiğinde bile yüksektir. Hayatının hiçbir döneminde sigara kullanmamış ve önemli derecede alkol kullananlarda (günde üç kadeh veya daha fazla) baş boyun kanseri riskinde artış bildirilmiştir.³³ Bazı çalışmalar fazla alkol tüketiminin tüm sigara içme düzeylerinde riski arttırdığını göstermektedir.^{34,35}

Alkol ve tütünü metabolize eden enzimlerindeki seçilmiş gen polimorfizmleri ile artmış baş boyun kanseri riski arasında bağlantı kurulmaktadır.^{33,36} Lieber³⁷, alkolün aşırı kullanımının ve alkolle ilişkili hastalıkların kanser oluşturmadaki muhtemel mekanizmaları şu şekilde toplamıştır:

1. Direkt temas sonucu oluşan lokal etki
2. Alkollü içeceklerde dūřuk seviyelerde karsinojen bulunması (polisiklik hidrokarbonlar, asbest lifleri, nitrozaminler)
3. Sekonder karsinojenleri aktive eden mikrozomal enzimlerin indüksiyonu
4. Etanol ve metabolitlerinin sebep olduğu hücresel hasar
5. Aşırı alkol kullanımının sebep olduğu beslenme bozukluğu

Alkolün kanserojen etkisi özellikle dil, ağız tabanı, vallekula, piriform sinüs ve servikal özefagus kanserlerinde belirgindir. Oral kavite kanseri gelişen hastaların %75-80'inin alkol kullandığı tespit edilmiştir. Alkol kullananlarda oral kavite kanseri riski 6 kat artmıştır. ²⁸ Sigara kullanımı sonrası larenksin tüm bölgelerinde kanser gelişme riski artarken alkol kullanımı sonucu yalnızca supraglottik larenkste kanser gelişme riski artar.

Sigara ve alkolün etkilerinin sinerjistik olduğu yani, her iki ajanın ayrı ayrı kullanımlarında ortaya çıkan risk artışının toplam risklerinden daha fazla olduğu bildirilmektedir. ^{32,38} Alkol ve sigara kullanımı tek başlarına riski 2-3 kat arttırırken birleştiklerinde risk 15 kattan fazla artmaktadır. ¹⁶

2.4.3. Virüsler

Belirli baş boyun kanserlerinin gelişmesinde HPV'nin rolü olduğu öne sürölmektedir. ³⁹ Human papilloma virüsünün (HPV) oral mukozada proliferatif yassı epitel lezyonlarına yol açtığı ve bu lezyonlarında oral mukozada kanser oluşturabileceği düşünölmektedir. Özellikle tip 16 ve 18 olmak üzere HPV'nin

orofarengeal kanserlerin %25'i ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. ^{40,41} Tümör spesimenlerinde virüsün varlığı virüsün tek başına nedensel rol olduğunu doğrulamaz, etiyolojik rol ek klinik ve moleküler veri ile anlaşılabilir. HPV pozitif orofarengeal kanser hastaları farklı bir grup oluştururlar. Bu hastalar sıklıkla sigara kullanmazlar ve kötü diferansiye yassı hücre histolojisi olan genç hastalardır. Bu grubun diğer farklı özellikleri arasında fazla cinsel partnere sahip olma, ilk cinsel ilişkisinin genç yaşta olması ve oral seks hikayesi yer alabilir. ⁴²

Ebstein Bar virüsünün (EBV) nazofarengeal karsinomun gelişme basamaklarında rol oynadığı bilinmektedir. Diğer baş-boyun kanserli hastalarda olmamasına rağmen nazofarenks kanserli hastaların serumunda EBV antikorları saptanmıştır. Çocukluk yaşlarında geçirilen enfeksiyöz mononükleoz sırasında virüsün nükleer antijen ve latent membran proteinleri üreterek nazofarenks epitelinde büyümeyi uyardığı, yeni hücrelerde viral genomun replikasyonunu ve virüsün dağılımını etkilediği gösterilmiştir. ^{9,43}

2.4.4. Diyet

Diyet, alkol ve sigaradan bağımsız olarak baş boyun kanserlerinde risk faktörüdür. Beslenme yetersizliği ve dengesizliği Avrupa'da %10-15'e kadar nedensel rol oynayabilmektedir, fakat belirli bir diyet bileşeninin eksikliği ile kanser riski ilişkisi çelişkilidir. ⁴⁴ Epidemiyolojik çalışmalar beta karoten ve A vitaminin epitelyal neoplazmlara karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Yaklaşık 500 karotenoidin koruyucu rolü yanında karotenden zengin besinlerdeki diğer maddelerin de koruyucu etkide rolü olabileceği düşünülmektedir. Sebzedden

(özellikle karotenden zengin) ve meyveden zengin diyet riski azaltmaktadır. Yapılan bir çalışmada kadınlarda taze sebze ve meyveden oluşan diyetle oral kavite tümörü riskinin azaldığı gösterilmiştir.⁴⁵ Bosetti ve ark.'nın yaptığı çalışmada yağda kızarmış yiyeceklerin larengeal kanser riskini arttırdığını bildirilmiştir.⁴⁶ Alkolle ilişkili beslenme yetersizliği iyi tanımlanmıştır ve baş boyun kanserlerinin etiyolojisinde rol oynayabilir. Sigara kullanımının besinlerdeki karotinoidlerin emilimini azalttığı bildirilmektedir. Demir eksikliği anemisi ve özefageal ağrı olan yaşlı bayanlarda artmış postkrikoid bölge kanseri riski mevcuttur ve bu bileşenler Plummer-Vinson sendromu olarak tanımlanmıştır. Plummer-Vinson sendromlu hastalarda kanser gelişme oranı ise %10'dur.²⁸ Riboflavin ve demir eksikliği oral kavite kanserleri ile ilişkili olabilir. Riboflavin eksikliğinin mukozada displastik değişiklikler yaptığı düşünülmektedir. Kadınlarda sık görülen aklorhidrik demir eksikliği anemisi, farenks ve ağız mukozasında displastik değişiklikler yapabilir. Bu değişiklikler sonrasında oral lökoplaki ve oral kavitedeki yassı epitel hücreli karsinom insidansı artmaktadır.

Hayvan çalışmaları A vitaminin epitelyal tümörler üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu göstermiştir.²⁰ A vitamini, hücresel diferansiyasyonun kontrolünde önemli fizyolojik role sahiptir. Hücre diferansiyasyonunun kaybı kanser oluşumunun temelini oluşturur.⁴⁷ Aynı zamanda A vitamini vücut immünitesinde de paya sahiptir. Retinolün metaboliti olan beta karoten, DNA'ya hasar veren hücre içi oksidatif reaksiyonlara karşı koruyucudur. Bu yüzden A

vitamini ve başka bir antioksidan olan C vitaminin yetersiz alınmasının kanser oluşumuna neden olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur.²⁰

2.4.5. Kanser Etiyolojisinde Genetik Yatkınlık

Baş boyun kanserlerinde baskın risk faktörleri tütün ve alkol kullanımı olmasına rağmen sigara ve alkol kullananların sadece bir bölümünde kanser gelişmektedir. Bu nedenle hastalığın etiyolojisinde genetik yatkınlık önemli olabilir. Diğer risk faktörleriyle birlikte sigara ve alkol kullanımı baş boyun yassı hücreli karsinom olgularının %5-10'unu açıklamamaktadır.⁴⁸

Baş boyun kanserlerinin genetik komponenti büyük aile çalışmalarıyla desteklenmiştir. Bu çalışmalarda birinci derece akraba olan hastalarda 3-8 kat artmış baş boyun kanseri riski gösterilmiştir.⁴⁹⁻⁵² Olgu kontrol çalışmalarından elde edilen veriler genetik yatkınlık hipotezinin baş boyun kanseri etiyolojisinde önemli rol oynadığını desteklemektedir. Bu hipoteze göre karsinojen metabolizasyon sistemlerinin verimliliğindeki kalıtsal değişiklikler, DNA tamir sistemleri, hücre siklusu kontrolü, apoptosis sistemleri veya bu faktörlerin kombinasyonu tütünün indüklediği kanserlerin riskini etkilemektedir.

Kansere genetik yatkınlığı arttıran faktörler şunlardır;

2.4.5.1. Mutajen Duyarlılığı

Baş boyun yassı hücreli kanser hastalarının genetik yatkın olduğunun laboratuvar bulguları asıl olarak genotoksisiteyi ve kanser riskini ölçen in vitro kromozom analizlerinden elde edilmiştir. Bleomisin kısa sürede kromatid kırıkları

halinde görülen DNA kırıklarını indükleyen bir mutajendir. Kromozom kırıklarının bleomisin ile indüklendiği olgu-kontrol çalışmalarında baş boyun yassı hücreli kanserli hastalarda sağlıklı popülasyonla karşılaştırıldığında hücre başına yüksek sayıda kırık bulunmuş.⁵³⁻⁵⁸ Nadir görülen, sigara hikayesi olmayan ve 30 yaş altı baş boyun kanseri hastaları özellikle mutajen duyarlıdır ve hücre başına çok yüksek kromozom kırık değerleri mevcuttur.⁵⁹

Baş boyun kanserli hastalarda belirli karsinojenlere karşı mutajen duyarlılığı tespit edilmiştir. Tütün ile ilişkili kanser mutajeni benzo[a]pirendiol epoksitin indüklediği mutajen duyarlılığı baş boyun kanserleri için risk faktörüdür.⁶⁰ Baş boyun kanserli hastalarda mutajen duyarlılığının bağımsız risk faktörü olduğu da gösterilmiştir.⁶¹ Üç yüz on üç baş boyun kanseri ve 334 kontrol hastasından oluşan bir çalışmada araştırmacılar mutajen duyarlılığı ve tütün-alkol maruziyetini baş boyun kanseri gelişimi ile korele etmişler.⁵⁸ Mutajen duyarlılığının kansere yatkınlık için bir biyoişaretçi olabileceği düşünülmüştür. Mutajen duyarlılığının aynı zamanda ikinci primer malignansilerin habercisi olabileceği bulunmuştur.

2.4.5.2. DNA Tamir Kapasitesi

DNA hasarı birkaç mekanizma ile tamir edilebilir. En temel mekanizmalar nükleotid eksizyon tamiri, baz eksizyon tamiri ve θ^6 -metilguanin DNA transferazdır. DNA tamir kapasitesi kalıtım, çevresel faktörler ve fiziksel faktörler sonucu bireyler arasında değişkenlik gösterir. Bazı bireylerde defektif DNA tamir mekanizması nedeniyle kansere yatkınlık artabilir. Bir olgu-kontrol çalışması

tütün ve alkol maruziyeti olan hastalarda XRCC1 gen polimorfizmlerinin baş boyun yassı hücreli kanseri riskinin artmasıyla ilişkisini göstermiştir.⁶² Baş boyun yassı hücreli kanserli hastalarda benzo[a]pirendiol epoksit karsinojenine maruziyet sonrası DNA tamir kapasitesinin zarar gördüğü gösterilmiştir.⁶³ DNA tamir kapasitesi aynı zamanda mutajen duyarlılığı ile korelerdir⁶⁴ ve artmış mutajen duyarlılığı ile beraber aile hikayesi olan hastalarda en yüksek risk mevcuttur.⁶⁵ Bu bağlamda DNA frajilitesi ve/veya azalmış tamir kapasitesi baş boyun yassı hücreli kanserlerine katkıda bulunuyor gibi görünmektedir.

2.4.5.3. Metabolik Enzim Polimorfizmleri

Karsinojen detoksifikasyonunun veriminin azalması, ko-karsinojen aktivasyonunun artması veya karsinojen maruziyeti sonrası yeterli DNA tamirinin olmaması nedenleriyle bireylerin kansere yatkınlığı artabilir. Sigara dumanı 70'ten fazla karsinojen içerir. Bu karsinojenlerin en önemli grupları polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, nitröz bileşiklerdir. Karsinojen emilimi, dağılımı veya birikmesinde hedef organda bireyler arası fark olması kansere yatkınlığı arttırabilir. Üst hava sindirim yolu mukozasının maruz kaldığı karsinojen dozu bu karsinojenlerin aktivasyonu (faz 1) ve detoksifikasyonundan (faz 2) sorumlu enzimlerce ayarlanır. Bu yollardaki genetik farklılıklar veya polimorfizmler bireyler arası yatkınlık farkının en önemli kaynağıdır. Moleküler epidemiyoloji çalışmalarında karsinojeni metabolize eden bazı enzim genlerinde polimorfizmler gösterilmiştir. Sigara karsinojenlerini aktive ve elimine eden genler arasından karsinojen metabolize eden (Glutasyon-S-transferaz) genlerin

boş genotipleri baş boyun kanserlerinde risk faktörü ve tütünün indüklediği karsinogeneizde genetik yatkınlığın işaretçisidir. ^{66,67} Sigaradaki diğer karsinojenlerden bazılarını ve alkolü metabolize eden enzimlerdeki gen polimorfizmlerinin de baş boyun yassı kanseri için genetik yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir.

2.4.5.4. Kansere Yatkınlık Oluşturan Genler

Kansere yatkınlık genleri de baş boyun yassı hücreli kanserine genetik yatkınlıkta rol oynayabilir. Bilinen kansere yatkınlık genlerinin çoğu tümör baskılayıcı genlerdir. Sıklıkla delesyona uğrayan kromozomal bölgelerin tanınması baş boyun yassı hücreli kanserlerinde rol alan tümör baskılayıcı genlerin (TBG) muhtemel yerlerini gösterebilir. Baş boyun yassı hücreli kanserlerinde sıklıkla görülen kayıp bölgeleri 3, 9 ve 17. kromozomların üzerindedir. Alel kaybı görülen diğer kromozomlar 1, 5, 8, 13, 18. kromozomlardır.⁴⁸

2.4.6. Diğer Etiyolojik Faktörler

Kötü oral hijyen, kötü diş bakımı ve kırık ve keskin dişler ile oral kanser arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. ⁶⁸ Bazı çalışmalar kötü oral hijyenin alkol gibi diğer risk faktörleriyle sinerjistik etkisinin olabileceğini göstermiştir. Bu etki kötü oral hijyenin etanolün asıl karsinojenik metaboliti olan asetaldehit oluşumunu arttırmasıyla gerçekleşmektedir. ⁶⁹

Güneş ışınları dudak, aurikula ve baş-boyun cilt kanserlerinin etiyolojisinde rol almaktadır. Güneşin 280–320 nm dalga boylarındaki ultraviyole-B ışınları deride hasara neden olurlar. Aynı dalga boyundaki ışınlar güneş yanıklarına da sebebiyet vermektedirler. Deride kanser oluşumu progresif bir olaydır ve 10-20 yıllık bir süre gerektirir. Güneş ışınlarına maruziyet sonrası oluşan dudak ve cilt kanserleri, erkeklerde daha sıktır.⁷⁰ Hava kirliliği, örneğin sülfür dioksit ve duman konsantrasyonları larenks yassı hücreli kanserleriyle pozitif korele bulunmuştur.¹⁶

Asbestos, çözeltiler, kömür ürünleri, kaynak dumanları, radyum, odun tozu, çimento ve diğer maddelere mesleki maruziyetler nazofarengeal ve paranazal sinüs kanserlerinin riskini arttırırken, orofarengeal ve larengeal kanser gelişimi ile ilgisiz gibi görünmektedir. Bununla birlikte, asbestozisin larenks kanseri yaptığı düşünülmektedir.

İmmün sistem, tümöre spesifik antijenleri tanıyarak kanserli hücreleri vücuda yabancı doku olarak algılar ve vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. İmmüsupresyon bu işlevi ortadan kaldırdığı için immüsuprese kişilerde kanser gelişme riski yükselir. İmmünite değişikliği baş boyun kanser gelişmesinde risk faktörü olarak düşünülmektedir. Yassı hücreli karsinomlu hastalar hastalığın erken evrelerinde bile düşük seviyede hücrel immüniteye sahiptir. İmmüsupresif akut faz proteinleri sigara kullanımı ve yaşla koreledir.

Baş boyun bölgesindeki beyin, tiroid bezi, tükürük bezleri, hipofarenks, larenks ve özefagus gibi organlarda radyoterapi sonrası artmış kanser riski vardır. Radyoterapi sonrası kanser gelişme süresi 6–40 yıl arasında değişmektedir.

Radyoterapi dozunun indüksiyon süresine bir etkisi olmadığı düşünülmektedir.²⁰ Çocukluk çağında radyoterapi uygulanmış olanlarda cilt kanseri gelişme riski 4 kat fazladır.⁷¹

2.5. Baş Boyun Kanserlerinin Moleküler Biyolojisi ve Karsinogenez

Normal hücre devamlı çevresel faktörlerin saldırısı altındadır ve kendini korumaya yarayan ve malignensiye dönüşümü engelleyen iç mekanizmalara sahiptir. Kanser, koruyucu mekanizmadaki bozukluklardan veya karsinojen maruziyeti sonucu oluşan DNA anormalliklerinden gelişebilir. Kanser gelişimi ile ilişkili faktörler kalıtsal olabilir (germ mutasyonları), çevresel veya bilinen karsinojen faktörlere maruziyetle edinilebilir veya koruyucu mekanizmanın kaybı sonucu gelişebilir.

Günümüzde yaygın kabul gören görüşe göre karsinogenez çok basamaklı bir süreçtir. Bu sürecin başlaması için iki düzenleyici gende de mutasyonların oluşması gerekmektedir. Bu genler çoğalmayı sağlayan protoonkogenler ile çoğalmayı inhibe eden TBG'dir. Protoonkogenler hücre çoğalmasını uyaran proteinleri kodlarken, TBG ürünleri hücre çoğalmasını azaltan etki gösterirler. Sağlıklı ve normal hücrelerde bu iki gen grubu birbirleriyle dengeli ve uyumlu bir şekilde çalışırlar. Mutasyonlar bu dengenin en büyük düşmanıdır ve protoonkogenlerdeki aktivasyon artışı ya da TBG'de aktivasyon azalması dengenin bozulmasındaki sebeptir. TBG'nin kaybı veya mutasyonu solid tümörlerde rastlanan en sık genetik değişikliktir. Protoonkogenler mutasyona uğrarsa veya düzeni bozulursa bu genler normal hücre büyümesini ve düzenini

destabilize etme kapasitesine ulaşır ve bu aşamada onkogen olarak adlandırılır.⁷² Onkogenlerin protoonkogenlere göre fonksiyonları daha fazladır ve dolayısıyla daha fazla miktarda ve daha aktif proteinler üretirler.

2.5.1. Protoonkogenler

Protoonkogenler normal büyümenin düzenlenmesinde ve hücre çoğalmasında son derece önemli rol oynayan normal hücresel genlerdir.⁷³ Hücrelerin mutajenik uyarısı büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, sitoplazmik sinyal iletimi proteinleri ve nükleer proteinleri gibi değişik kaynaklardan gelebilir.⁷⁴ Bu yolun her bir basamağında görev alan protoonkogenler keşfedilmiştir ve hücre yüzeyinden hücre çekirdeğine kadar uzanan düzenleyici ağda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Mutasyona uğrarsa veya düzeni bozulursa bu genler normal hücre büyümesini ve düzenini destabilize etme kapasitesine ulaşır ve bu aşamada onkogen olarak adlandırılır.⁷²

2.5.2. Onkogenler

Oluşan onkogen hücrelerin malign transformasyonuna katkıda bulunabilen ve insanlarda tümöre sebep olabilen genlerdir.⁷² Onkogen aktivasyonunun en az dört yolla oluştuğu bilinmektedir:

1. Yeni transkripsiyonel ilerleticinin geninin elde edilmesi
2. Kromozom kırılma noktalarına yakın protoonkogenlerin düzensizliğine sebep olan kromozom translokasyonu

3. Gen kopya sayının fazla olması nedeniyle gen amplifikasyonu. Bu işlev, pek çok malignansinin oluşmasında nedensel rol oynamaktadır.
4. Değişmiş protein ürünü ile sonuçlanan nokta mutasyonu

Onkogenlerin çoğu büyüme faktörü veya büyüme faktörü reseptörleri (hst-1, int-2, EGFR/erbB, c-erbB-2/Her-2, sis), intraselüler sinyal ileticileri (ras, raf, stat-3), transkripsiyon faktörleri (myc, fos, jun, c-myb), hücre siklusu düzenleyicileri (siklin D1) ve apoptosisle ilişkili (bcl-2, bax) onkogenlerdir.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve ligandları baş boyun kanserlerinde yaygın olarak çalışılmıştır. ⁷⁵⁻⁷⁷ EGFR m-RNA'sı tümörlerin %92'sinde normal mukoza ile karşılaştırıldığında 69 kat yüksek bulunmuş. ⁷⁸ Kromozom 17'de bulunan ve EGFR benzeri onkogen olan c-erbB-2'nin aşırı ekspresyonu baş boyun yassı hücreli karsinomlarının %75'inde gözlenmiş ve kısa sağ kalım ile korele bulunmuş. ⁷⁹

Baş boyun kanserlerinin %97'sinde kromozom 3p'nin kısmi veya tam kaybı, %70'inde 11q13 bölgesinde amplifikasyon bulunmuştur. ⁸⁰ Bir analizde primer baş boyun kanserlerinde olguların %30-60'ında 11q13 bölgesinin amplifikasyonu ve yeniden düzenlenmesi bildirilmiştir. ⁸¹⁻⁸³ 11q13'teki mevcut onkogenler arasında int-2, hst-1, siklin D1 ve ems-1 yer alır. Fibroblast büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olan int-2 geninin baş boyun yassı hücreli karsinom hastalarının %50'sinde amplifiye olduğu gösterilmiştir. ^{84,85}

Siklin D1 DNA sentezinin başlamasını ve hücrelerin G1/S geçişini düzenler. Siklin D1 amplifikasyonu baş boyun yassı hücreli karsinomlarının %34'ünde bildirilmiştir. ^{86,87} Siklin D1 amplifikasyonu veya aşırı protein üretimi

olan baş boyun yassı hücreli karsinom hastalarının 5 yıllık toplam sağ kalımları, düşük siklin D seviyeli hastalardan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.⁸⁸

1989 yılında yapılan 23 baş boyun kanserli hastadan oluşan bir çalışmada doku örneklerinin %50'sinde c-myc, N-myc, Ki-ras ve N-ras onkogenlerinden bir veya daha fazlasının 5–10 kat amplifikasyonu tespit edilmiş.⁸⁹ K-ras amplifikasyonu, nokta mutasyonu ve allel kaybı tütünün indüklediği baş boyun kanserleri ile ilişkili bulunmuştur.^{90,91}

2.5.3. Tümör Baskılayıcı Genler (TBG)

Ekspresyonu hücrelerin malign transformasyonunu inhibe eden gen sınıfıdır. Hücre siklusunu durdurmada ve apoptosiste görev alırlar. Bu genlerin mutasyonu neoplastik transformasyona yol açabilir. p53 TBG'nin mutasyonu akciğer, kemik kolon, meme ve çeşitli hematolojik malignitelerin içinde bulunduğu pek çok kanserde görülmektedir.**(92)** TBG'nin fonksiyonları nokta mutasyonlar, delesyonlar veya hücrel ve viral proteinlerin bağlanması gibi mekanizmalarla değişebilir.

2.5.3.1. p53

p53 geni kromozom 17p13.1'in kısa kolunda yer alır ve genom stabilitesini sağlayan 53kDa nükleer fosfoproteinini kodlar. Hücre siklusunun ilerlemesini, hücrel farklılaşmayı, DNA tamirini ve apoptosisi düzenler.⁹³ p53 proteinindeki mutasyonlar insanlarda bulunan en sık genetik değişikliktir.⁹⁴ Baş boyun kanserli hastalarda p53 gen mutasyonu erken evrede olur⁹⁵ ve tüm baş

boyun kanserlerinde insidansı %50–60 olarak bildirilmiştir.^{96,97} p53'ün mutant formları baş boyun kanserlerinde kötü prognozla ilişkilidir.⁹⁸

Sigara kullanımı baş boyun kanserleri için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Sigara kullanımının⁹⁹ ve tütün çiğnemenin¹⁰⁰ baş boyun yassı hücreli kanserlerinin erken evrelerinde p53'te değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir.¹⁰¹

Primer baş boyun kanserlerinde p53 proteininin ekspresyonu erken tümör rekürrensi ve ikinci primer tümörlerin gelişmesi ile ilişkili olması nedeniyle kısa sağ kalım süresinin anlamlı bir habercisi olarak bulunmuştur.¹⁰² Histopatolojik olarak negatif cerrahi sınırı ve servikal lenf nodu olan baş boyun kanserli hastalarda p53 mutasyonunun saptanması lokal rekürrens riskinin artışı ile ilişkilidir.¹⁰³

HPV ve baş boyun kanseri arasında ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. HPV 16/18'in onkojenik potansiyeli E6 onkoproteininin p53 proteinin yıkımına yardımcı olması nedeniyle olabilir.¹⁰⁴

2.5.3.2. p16

p53 ve p16 tümör proteinlerinin asıl rolü hasar görmüş hücreyi S fazına girmeden G1 fazına taşımak ve tamirine izin vermektir. Bu, hasar görmüş kansere yol açan hücrenin çoğalmasını ve hücre siklusuna taşınmasını engeller. Hasar görmüş hücre tamir edilemezse TBG'ler apoptosis olarak bilinen hücreyi öldürme görevini yerine getirirler. Baş boyun kanserlerinde p16 mutasyonu erken evrede olur¹⁰⁵ ve HPV tarafından etkilenebilir.¹⁰⁶ Genel olarak tüm baş boyun kanserlerinin %70'inde p16 proteininde değişiklik görülmektedir.¹⁰⁷

Bax, Bcl-2 ve p53 proteinleri apoptosisin düzenlenmesinde rol alır ve bazı tümör tiplerinin prognozu ile koreledir. Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu ve Bax ekspresyonunun kaybı anlamlı derecede kötü prognozla ilişkilidir.

2.6. İnflamasyon

Hücre zedelenmesine neden olan ekzojen ve endojen uyarılar vaskülarize bağ dokularında inflamasyon adı verilen kompleks bir reaksiyona yol açabilirler. İnflamasyon hücre hasarına yol açan etkenle beraber yıkım sonucunda oluşan nekrotik doku ve hücreleri de ortadan kaldırmayı amaçlayan koruyucu bir yanıttır. İnflamasyon bu koruyucu görevi mikroplar ve toksinler gibi zararlı etkenleri dilue ederek, parçalayarak ve diğer yollarla nötralize ederek yerine getirir. Daha sonra hasarlı bölgeleri onaracak ve sonunda iyileşmeyi sağlayacak bir dizi olayı harekete geçirir.

İnflamasyon, enfeksiyonu yok etmeye yardım eder ve onarım ile de yaralanmanın iyileşmesini mümkün kılar. Ancak her iki olay da belirgin bir hasar oluşturma potansiyeli taşırlar. İnflamatuvar yanıtta rol oynayan pek çok eleman mevcuttur. Bunlar dolaşımdaki hücreler ve plazma proteinleri, vasküler duvar hücreleri, çevre bağ dokusunun ekstraselüler matriksi ve hücreleridir. Dolaşımdaki hücreler kemik iliğinden kaynaklanan polimorfonükleer lökositler (nötrofiller), eozinofiller, bazofiller, lenfositler, monositler ve trombositlerdir. Dolaşımdaki proteinler çoğunlukla karaciğer tarafından sentezlenen pıhtılaşma faktörleri, kininojenler ve kompleman içerikleridir. Vasküler duvar hücreleri, kanla doğrudan temasta olan endotelial hücreler ve daha altta yerleşmiş olan ve

damarlara tonusunu veren düz kas hücreleridir. Bağ dokusu hücreleri, invazyona karşı gözcü olan mast hücreleri, makrofajlar ve lenfositlere ek olarak ekstraselüler matriksi sentezleyen ve yarayı doldurmak üzere çoğalan fibroblastlardan oluşur.

İnflamasyonun basit özeti şu şekildedir; başlangıçtaki inflamatuvar uyaran, plazma ve bağ dokusu hücrelerindeki kimyasal medyatörlerin salınımını tetikler. Beraberce veya düzenli bir sırayla hareket eden bu çözülebilen medyatörler başlangıçtaki yanıtı güçlendirirler ve sonradan oluşan vasküler ve hücrel yanıtı regüle ederek gelişimini etkilerler. Hasar veren uyarı uzaklaştırılınca inflamatuvar yanıt sonlanır ve inflamatuvar medyatörler dağılırlar, katabolize olurlar veya inhibe edilirler.

İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Akut inflamasyon nispeten kısa sürelidir ve birkaç dakika ile birkaç gün içinde sonlanır. Kronik inflamasyon daha uzun sürelidir (günler ile yıllar arasında değişebilir) ve karakteristik histolojik bulgusu lenfosit ve makrofaj toplanmasının yanı sıra doku yıkımı ve onarımıdır. Bu onarım vasküler proliferasyon ve fibrozis ile birliktedir.

2.7. Siklooksijenazlar, Lipoksijenazlar Ve Nitrik Oksit Sentaz

2.7.1. Siklooksijenazlar

Siklooksijenaz enzimleri (EC 1.14.99.1) [COX, Prostaglandin G/H sentaz (PGHS)], bir doymamış yağ asidi olan araşidonik asitten, prostaglandinlerin (PG) biyosentezinde ilk iki basamağı katalizleyen anahtar enzimlerdir.¹¹⁴

Araşidonik asit (AA, ω -6 PUFA, 5,8,11,14-eikozatetraenoik asit) membran fosfolipidlerinin fosfolipaz A2 (PLA2) enzimi tarafından katalizlenen hidrolizi

sonucu oluşur. COX, araşidonik asiti prostanoidlerinin (PG, prostasiklin ve tromboksanların genel adı) öncülü olan prostaglandin H₂ (PGH₂)'ye dönüştürür. Bu işlemi sahip olduğu iki aktif bölge aracılığıyla yapmaktadır: Bunlardan biri araşidonik asitin hidroperoksi endoperoksit PGG₂'ye oksidasyonunu sağlayan siklooksijenaz aktif bölgesidir, diğeri ise PGG₂'nin hidroksi endoperoksiti PGH₂'ye indirgenmesini sağlayan ve hem grubu içeren peroksidaz aktif bölgesidir.¹¹⁵

COX'un, sentezine aracılık ettiği PG'ler lipid tabiatında lokal hormonlardır. Hızla yıkılmaları sebebiyle vücudun diğerk bölgelerine taşınamazlar, otokrin veya parakrin etkilidirler. PG'ler teknik olarak hormon sayılmalarına karşın güçlü fizyolojik etkileri olan aracı moleküllerdir. Etkileri bakımından hormonlara benzetilmelerine rağmen, özgün bezlerden ziyade hemen hemen tüm dokularda oluşmaları ve genellikle lokal olarak etki etmeleri bakımından hormonlardan ayrılırlar.^{114,116}

COX'un katalitik aktivitesinin son ürünü olan PGH₂, etkinlikleri dokulara göre değişen çeşitli izomerazlar tarafından prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin F₂ (PGF₂), prostasiklin (PGI₂) ya da tromboksan A₂ (TXA₂)'ye dönüştürülür (Şekil 7). Bu son ürünler vücutta ağrı, ateş, inflamasyon, kan pıhtılaşması, ovulasyon, doğumun başlatılması, kemik metabolizması, gastrik mukozanın korunması, yaraların iyileşmesi, sinir gelişimi, immün yanıt ve böbrek fonksiyonlarında önemli roller üstlenirler.¹¹⁴

COX enziminin, COX-1 ve COX-2 adı altında iki izoenzimi tanımlanmıştır. COX'un her iki izoformu benzer yapısal özellik (%60 homoloji)

göstermelerine ve aynı reaksiyonu katalizlemelerine karşın substrat, inhibitör ve hücre içi yerleşim bakımından önemli farklılıklara sahiplerdir. Bu nedenle her iki COX formu farklı türde PG'lerin sentezine aracılık eder.¹¹⁵

Bu iki enzim arasında genel bir ayırım yapılacak olursa COX-1'in fizyolojik, COX-2'nin ise patolojik bir enzim olduğu söylenebilir. COX-2'nin patolojik olarak nitelendirilmesinin temel nedeni COX-2'yi indüklediği bilinen uyarıların hemen hepsinin inflamasyon ile bağlantılı olmasıdır.¹¹⁶ Bu uyarılar arasında IL-1/β, TNFα., endotel hücresi büyüme faktörü (ECGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), endotoksinler ile onkogenler ve forbol esteri gibi mitojenik uyarılar sayılabilir.¹¹⁷

2.7.1.1. Siklooksijenaz-2 (COX-2, PGHS-2)

1991 yılında çeşitli laboratuvarlarda COX aktivitesine sahip ikinci bir gen ürünü, yani COX-2 tanımlanmıştır. COX-2 geni, 1. kromozomun uzun kolu (1q25.2-q25.3) üzerine yerleşmiştir. Bu gen 8.3 kb uzunluğunda olup, 4.5 kb'lık bir mRNA'yı kodlamaktadır. COX-2 proteini ise 604 aminoasit uzunluğunda ve yaklaşık 72 kD ağırlığında proteindir.¹¹⁸

COX-2 geni 10 ekson içermekte olup, sinyal peptid bölgesi, dimerizasyon bölgesi, membran bağlanma bölgesi ve katalitik aktivite bölgesi olmak üzere 4 yapısal bileşene sahiptir.¹¹⁹ Ayrıca 10. ekson, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların (NSAİİ) etkinlikleri için önemli olan özgün amino asit birimlerinin şifrelerini taşır. Örneğin, aspirin tarafından asetillenerek COX enziminin

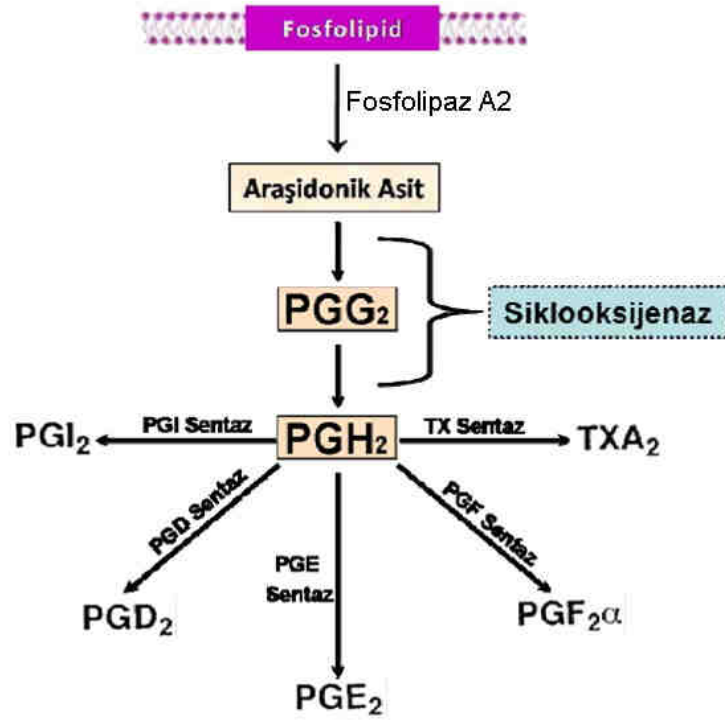
inhibisyonuna ve dolayısıyla PG sentezinin engellenmesine neden olan serin aa birimi (Ser 516) bu ekson tarafından kodlanır.¹²⁰

Normal şartlarda genellikle sağlıklı hücrelerde bulunmayan COX-2, akut ve kronik inflamasyon gibi patolojik durumlarda önemli rolleri olan PG'lerin (PGE2 ve PGF2) sentezinden sorumludur.¹¹⁴ Bu nedenle günümüzde COX-2'ye özgü anti-inflamatuar ilaçlar geliştirilerek inflamasyonda etkili olan PG'lerin sentezi durdurulmaktadır.

Özellikle inflamasyon, ağrı, ateş, ovülasyon, hamilelik, doğum, böbrek fonksiyonları, kemik metabolizması, doku tamiri, felç, miyokardiyal infarktüs, diyabet, Alzheimer hastalığı gibi süreçlerde ve kolorektal, prostat, pankreas, deri, özofagus, meme, akciğer kanseri gibi bazı kanser türlerinde COX-2'nin ekspresyonunun fazla olduğu gözlenmektedir.¹²¹

COX-2, çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri veya mitojenler tarafından uyarılarak inflamatuvar süreçte görev alan makrofajlarda, monositlerde, sinoviyal hücrelerde, kondrositlerde, fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde eksprese edilir.

¹²¹



Şekil 1. Siklooksijenaz ve izomerazlar aracılığı ile prostanooidlerin sentezi

2.7.2. Araşidonat Lipoksijenazlar

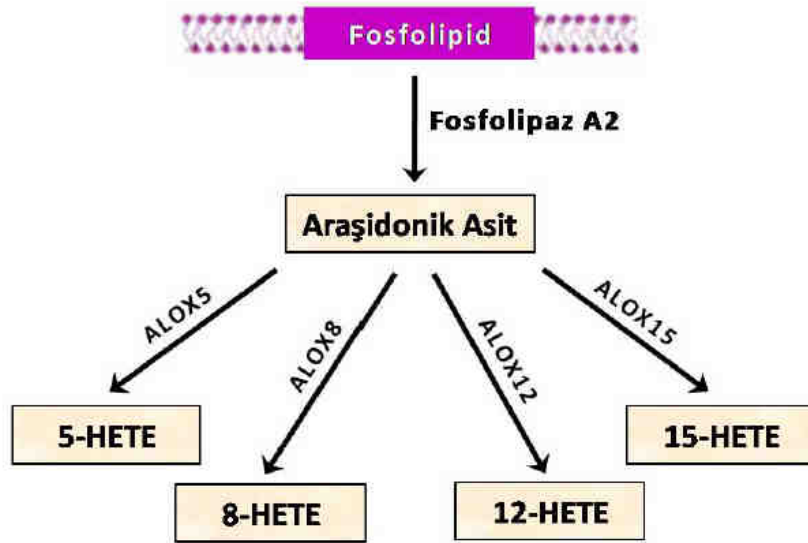
COX izoformları gibi lipoksijenazlarda (ALOX, ALOX, EC 1.13.11.12) AA üzerinde etki gösterirler. Bu enzim ailesi serbest ya da esterifiye haldeki çoklu doymamış yağ asitlerine genellikle 5., 8., 12. ve 15.C atomlarından bölgeye özgü (regioselektif) olmak üzere oksijen transfer ederler.¹²²

ALOX aktivitesi, substrat olarak lipid ile atmosferik oksijen varlığına ihtiyaç duyan, bir bimoleküler reaksiyondur. Eğer bunlardan birisi sınırlı olur ise (ciddi hipoksi durumu gibi) enzimin katalitik aktivitesi değişerek farklı reaksiyon ürünleri oluşmaktadır.¹²³ Bu enzimler yağ asiti dioksijenazlar olarak sınıflandırılırsalar da, peroksidaz, oksijenaz, lökotrien sentaz, lipoksin sentaz ve hepoksilin sentaz gibi çok farklı katalitik aktivitelere sahiptir.¹²⁴

Bitkilerde, hayvanlarda, bazı deniz canlılarında ve mikroorganizmalarda çeşitli ALOX izoformlarının varlığı gösterilmiştir. Memelilerde dört farklı ALOX izoformu bilinmektedir: ALOX5, ALOX8, ALOX12 ve ALOX15. Enzim adlarındaki bu sayılar AA omurgasında oksijen aktarılan C atomunun numarasını belirtmektedir. ¹²⁴ ALOX enzimleri AA'yı biyolojik yönden aktif olan hidroperoksi-eikozatetraenoik asit (HPETE) metabolitlerine dönüştürür ve daha sonra bunların indirgenmesi ile hidroksieikosatetraenoik asit (HETE) oluşmaktadır. ¹²⁵ (Şekil 2). 5-, 12- ve 15-HETE, ALOX izoformları tarafından oluşturulan önemli AA metabolitleridirler. ¹²⁶

ALOX5 hariç, insandaki diğer ALOX genleri 17. kromozomun kısa kolu üzerinde birkaç megabazlık bölge içerisinde kümelenmiştir. Bu durum aynı kromozom üzerindeki çoklu ALOX genlerinin duplikasyonlar sonucu oluştuğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir, ancak henüz ALOX izoformlarının evrimi tam olarak açıklanabilmiş değildir. ¹²⁴

ALOX izoformları, inflamasyon, immün yanıt ve tümör oluşum sürecine etkileri açısından COX ve PG'ler kadar ayrıntılı çalışılmamıştır, ancak güncel çalışmalar bazı ALOX ürünü metabolitler ile COX-2 ürünü metabolitlerin inflamasyon üzerinde ortak etkileri olduğunu göstermiştir. ¹²⁷



Şekil 2. ALOX izoformları tarafından AA'nın dönüştürüldüğü metabolitler

2.7.2.1. Araşidonat 12-Lipoksijenaz (ALOX12, ALOX12)

ALOX12 enzimi, AA'nın 12 numaralı karbon atomuna bir moleküler oksijen aktararak 12-hidroperoksieikozatetraenoik asit (12-HPETE) oluşumunu katalizler. Daha sonra 12-HPETE'nin indirgenmesiyle yine aktif bir metabolit olan 12-HETE meydana gelir.

ALOX12'nin, ilk defa tanımlandıkları hücre tiplerine göre adlandırılan, üç izoformu mevcuttur: Platelet tipi, lökosit tipi ve epidermis. Lökosit tipi ALOX12 ekspresyonu yaygınken, trombosit ve epidermis izoformlarının ekspresyonu sadece birkaç hücre tipindedir. Lökosit tipi ALOX12 başlıca mast hücrelerinde, eozinofillerde, monositlerde, dendritik hücrelerde ve bronşial epitel hücrelerde gözlenmektedir.¹²³

ALOX12 geni 17. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiştir (17p13.1). Kofaktör olarak demir bulunduran ve doymamış yağ asitlerine oksijen aktaran

birkaç ALOX izoformundan bir tanesidir. Hayvanlar aleminde belgelenen ilk ALOX izoformu ALOX12'dir.¹²³

ALOX12 geni 16100 baz çiftinden oluşmaktadır. 14 ekson içeren bu genin transkript uzunluğu 2335 bazdır. ALOX12 enzimi ise 662 aa'ten oluşan ve 70 kD'luk moleküler ağırlığa sahip bir proteindir.¹²³

12-HETE'nin ve diğer AA kökenli metabolitlerin (eikozanoidler) biyosentezi NF-κB tarafından COX ve ALOX genlerinin transkripsiyonel düzenlenmesi yapılarak gerçekleşir. Özellikle inflamasyon ve kanser olgularında sıkça karşımıza çıkan transkripsiyon faktörü NF-κB, COX-2 ve ALOX12 genlerinin promotöründe bulundurdıkları cis-etkili κB elementi sayesinde, promotöre bağlanarak enzimlerin ekspresyonlarını düzenler.¹²⁵ ALOX12 ile NF-κB aktivasyonu arasındaki doğrudan ilişki özellikle bazı kanser hücrelerinde rapor edilmiştir. ALOX12 aracılığıyla oluşturulan 12-HETE metaboliti, invazyonu, metastazı ve anjiogenezisi artırırken, bunun yanında tümör hücrelerini apoptozisten alıkoymaktadır.

Lökositler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi immün hücrelerin uyarılmasında etkin olan inflamatuvar indükleyiciler endojen ve ekzojen AA'leri kullanılarak bahsi geçen çeşitli metabolitlerin üretimine neden olurlar. Özellikle COX ve ALOX ürünü olan bu metabolitler çeşitli inflamatuvar ve neoplastik hastalıklarda artış gösterdiğinden, bu enzimlere karşı oluşturulan inhibitör ilaçlar inflamasyonun çözülmesinde ve kanser oluşumunun önlenmesinde yarar sağlamaktadır.¹²⁸

2.7.3. Nitrik Oksit

Alfred Nobel'in 1867'de nitrogliserinin patlayıcı olarak kullanımı ve üretimi ile ilgili öncü çalışmaları dinamitin keşfi ile sonuçlanmıştı. Tıpta nitrogliserin, nitrovazodilatör prototipi olarak bilinmekte ve patlayıcı olarak kullanımından çok angina tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır.¹²⁹

Alfred Nobel'in ölümünden 100 yıl sonra Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü nitrogliserinin etkin molekülü nitrik oksitin (NO, azot monoksit) keşfi ve biyolojik etkilerini açıklayan çalışmalarından dolayı Robert Furchgot, Ferid Murad ve Louis Ignarro'ya verilmiştir. 1987 yılında, damar endotelinden, endotel kökenli gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında nitrik oksit sentaz enzimi keşfedilmiş ve daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu anlaşılmıştır.¹²⁹

NO, biyoaktif metabolitlerin en küçüklerinden biridir. Yarı ömrü sadece birkaç saniye olup, bu nedenle yakın çevresi üzerinde etkindir. Düşük molekül ağırlığı ve lipofilik yapısı nedeni ile kolay ve hızlı bir şekilde hücre zarlarından geçebilmektedir. Bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom ya da moleküllere serbest radikal denilmektedir ve NO taşıdığı ortaklanmamış elektron nedeniyle bir radikalik moleküldür. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücre için zararlıdır, ancak NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde bulunmaktadır ve bu özellikler NO'yu ideal bir molekül yapmaktadır. Buna karşın aşırı ve kontrolsüz NO üretimi hücreler için zararlı olabilmektedir.¹³⁰ Serbest radikaller katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPX) gibi antioksidan sistemler tarafından bir

denge içerisinde tutulur. Geçici olmasına rağmen serbest radikallerin antioksidanlara karşı üstünlüğü, yani dengenin oksidan lehine kayması, çeşitli hücre hasarlarına ve kronik hastalıklara yol açabilir.

NO fizyolojik ve inflamatuvar süreçte önemli bir aracı molekül olarak kabul edilir. Kan damarlarının gevşemesinde, solunum, gastrointestinal, genitoüriner sistemde NO-bağımlı mekanizmalar kullanılmakta ve merkezi sinir sisteminde bir nörotransmitter olarak hafızanın oluşumunda rol oynamaktadır. NO ayrıca trombositlerin yapışarak birikmesini engeller, kalp kasılmalarında düzenleyicidir ve iyon kanallarının açılıp/kapanmasına katkıda bulunur. Bunlara ek olarak nonspesifik immünitede de rolü vardır. Sitotoksik özelliğe sahip olduğundan, vücut savunması ve immünolojik reaksiyonlar sırasında aktive olmuş makrofajlar tarafından çok miktarda üretilirler.^{131,132}

2.7.3.1. Nitrik Oksit Biyosentezi ve iNOS

NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-arjinin'in oksidatif deaminasyonu sonucu oluşan ve sayısız biyolojik sürece dahil olan gaz tabiatında küçük bir radikal moleküldür.¹³³ $L\text{-Arg} \rightarrow \text{NO} + L\text{Sitrulin}$, biçiminde özetlenebilecek tepkimede NOS katalizasyon için moleküler oksijen ve kofaktör olarak da NADPH'a ihtiyaç duymaktadır. NOS'un birbirine yapısal olarak çok benzeyen 3 izoformu bulunmaktadır.¹³⁴

- Nöronal NOS (nNOS – NOS1)
- İndüklenebilir NOS (iNOS – NOS2)
- Endotelial NOS (eNOS – NOS3)

eNOS ve nNOS düşük miktarlarda sürekli olarak eksprese edilir ve kalmodulin varlığında sitoplazmik Ca^{2+} artışına paralel olarak ekspresyonları artar. Ca^{2+} 'un hücre içine akışı NO'nun hızla üretilmesine neden olur. Buna karşın iNOS, çeşitli sitokinler ve diğer uyaranlar tarafından makrofajların ve diğer bazı hücre gruplarının aktive edilmesiyle indüklenerek NO sentezine katılır ve bunun için de Ca^{2+} artışına ihtiyaç duymaz.¹³²

iNOS geni 37 kb'lık uzunluğunda olup, 26 ekson içermektedir. Kromozom 17'nin sentromeri ile uzun kolu arasında (17cen-17q11.2) yerleşik olan iNOS geninin ürünü 1153 aa uzunluğunda ve 131 kD ağırlığında bir proteindir.¹³²

NO'nun etkilerinin çoğuna aracılık eden klasik yolak, çözünebilir guanilat siklaz (sGC) aktivasyonu ve GTP'nin, ikincil haberci molekül, siklik guanozin monofosfatlara (cGMP) dönüşümüdür.¹³² NO inflamasyon reaksiyonlarında çok yönlü bir role sahiptir. İnflamatuar ajanların ve sitokinlerin varlığında iNOS'un ekspresyonu artarak NO miktarı yüksek düzeylere çıkar.¹³¹ Sitokinler tarafından aktive edilmiş makrofajların tükettiği L-arjinin'in 1/3'ü NO üretmek için kullanılmaktadır.¹³⁵ NO'nun akut ve kronik inflamasyonda etkili olduğu bilinmektedir ve NOS inhibitörleri ile gerçekleştirilen tedavinin ratlarda akut inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Çeşitli dokular inflamatuvar sitokinlere maruz bırakıldığında ise iNOS ekspresyonunda ve dolayısıyla NO miktarında artış gözlenmiştir.¹³¹ Çalışmamızda, bu bilgiler ışığında baş boyun yassı hücreli karsinomlarında inflamasyon ile ilişkili COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ekspresyon seviyeleri Real-time PCR yöntemi aracılığıyla araştırılmak istenmiştir.

2.7.4. Araşidonik Asit Metabolitleri, Nitrik Oksit (NO) ve İnflamasyon

Araşidonik asit 20 karbondan oluşmuş, doymamış bir yağ asitidir. Esas olarak diyetle alınan linoleik asitten oluşur ve vücutta sadece ester halinde hücre membran proteinlerinin bir bileşeni olarak bulunur. Araşidonik asit, bu fosfolipidlerden hücresel fosfolipazlar yoluyla salınır. Hücresel fosfolipazlar mekanik, kimyasal, fiziksel uyarı veya C5a gibi inflamatuvar medyatörlerce aktive edilirler. Araşidonik asit metabolizması iki farklı enzimle iki ana yola ayrılır: siklooksijenaz yolu ve lipooksijenaz yolu. Siklooksijenaz yoluyla prostoglandinler ve tromboksanlar, lipooksijenaz yoluyla lökotrienler ve lipoksinler sentezlenir. Araşidonik asit metabolitleri eikozanoid olarak da adlandırılır. Eikozanoidler inflamasyonun her basamağında aracılık edebilirler.⁴

Araşidonik asitin metabolizması sonucu oluşan prostoglandin, lökotrien ve lipoksin gibi ürünler inflamasyon ve hemostaz başta olmak üzere pek çok biyolojik etkiye sahiptir. Bu ürünler oluşturuldukları yerde bölgesel etki gösterirler ve takiben hızlıca spontan veya enzimatik olarak ortadan kaldırılırlar.

PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ ve tromboksan (TXA₂) siklooksijenaz yolu ürünleridir ve bunlar spesifik bir enzim ile oluşur. Bu enzimler her dokuda anlamlı düzeyde bulunmaz. Örnek olarak, trombositlerde tromboksan sentetaz enzimi vardır ve dolayısıyla TXA₂ gibi güçlü bir trombosit agregan ajan ve vazokonstriktör ajan bu hücrelerde ana prostoglandin ürünüdür. Buna karşın endotel tromboksan sentetaz içermez, ancak PGI₂ gibi güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü ve vazodilatatör ajanın oluşumunu sağlayan prostasiklin sentetaz içerir. PGD₂ mast hücrelerindeki siklooksijenaz yolunun ana

metabolitidir. Burada PGE_2 ve PGF_2 ile birlikte bulunurlar ve PGD_2 vazodilatasyon yaparak ödeme neden olur.

NO'nun, inflamasyonda pek çok görevi vardır. Bu görevler arasında, vazodilatasyon, trombosit aktivitesinin her aşamasında antagonist etki, inflamatuvar bölgelerinde lökosit birikiminin azaltılması, aktif makrofajlarda mikroorganizmaları öldürme yer alır.

İnflamasyon; ağrı, kızarıklık ve bazen de fonksiyon kaybı ile karakterize edilen ve doku hasarlarına veya enfeksiyonlara karşı oluşturulan lokalize koruyucu reaksiyonlar olarak bilinmesine rağmen, çeşitli kanser türlerinin de dahil olduğu bir çok hastalıkta rolü olduğuna inanılmaktadır. Akut inflamasyon savunma cevabının bir parçası iken, kronik inflamasyon kansere, diyabete, kardiyovasküler, pulmoner ve nörolojik hastalıklara neden olabilmektedir. Birçok proinflamatuvar gen ürününün apoptozisin baskılanmasında, proliferasyonda, angiogeneziste, invazyonda ve metastazda kritik roller üstlendikleri tanımlanmıştır.

2.8 İnflamasyon ve Kanser

İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişkinin nasıl geliştiğini anlamak için inflamasyonun ne olduğunu ve fizyolojik ve patolojik süreçlere nasıl katkıda bulunduğunu anlamak gereklidir. Doku hasarına yanıt olarak, multifaktoriyel kimyasal uyarı ağı sorunlu dokuyu iyileştirmek için konak yanıtını başlatır ve sürdürür. Bu yanıt lökositlerin (nötrofil, monosit, eozinofil) aktivasyonunu ve venöz sistemden hasar bölgesine migrasyonunu içerir. Doku mast hücreleri de

önemli role sahiptir. Nötrofiller için dört aşamalı mekanizmanın bu inflamatuvar hücreleri hasar bölgesine ve geçici ekstraselüler matrikse yönlendirilmesini koordine ettiğine inanılmaktadır. Bu aşamalar şunlardır; vasküler endotel boyunca yuvarlanmayı hızlandıran adezyon moleküllerinin selektin ailesinin aktivasyonu, sitokin ve lökosit aktive eden moleküller tarafından yönlendirilen lökosit integrinlerini aktive ve upregüle eden sinyallerin başlaması; nötrofillerin sırasıyla endotelial vasküler hücre adezyon molekülü-1'e (VCAM-1) ve MadCAM-1'e bağlanmak yoluyla immobilizasyonu; muhtemelen matriks metalloproteinazlar gibi ekstraselüler proteazlar tarafından hızlandırılan endotel boyunca hasar bölgesine transmigrasyon.

Kemokin olarak adlandırılan ve spesifik lökosit popülasyonlarına yüksek derecede çekim gücü olan bir kemotaktik sitokin ailesi, efektör hücreleri akım yönünde yönlendirir ve inflamatuvar yanıtın doğal gelişimini belirler. İnflamatuvar bölgede bulunan kemokin profili kronik hastalığın gelişmesinde önemlidir. Proinflamatuvar sitokin tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), inflamatuvar sürecin pekçok başka yönlerine aracılık ederken inflamatuvar hücre popülasyonunu kontrol eder. İnflamasyon sürecini hem pozitif hem de negatif etkileyen TGF- β 1 de önemlidir.

İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişkiye yönelik araştırmalar öncelikle lökositler gibi inflamatuvar hücreler tarafından üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin mutajenik saldırı yapıp yapmadığı ve tümörün başlamasıyla sonuçlanıp sonuçlanmadığına yönelik olmuştur.¹¹¹ Günümüzde inflamasyondan kanser gelişmesinin inflamatuvar hücreler ile beraber sitokinler, kemokinler ve enzimleri

içeren medyatörler tarafından oluşturulan süreç olabileceğinin farkına varılmıştır.

¹¹² Bu konak yanıtı tümörleri baskılayabilmesine rağmen, birçok sinyal yoluyla kanser gelişimini hızlandırabilir. ¹¹³

2.9. COX-2 ve Kanser

2.9.1. COX'un Karsinogenezdeki Rolü için Preklinik Kanıtlar

Prostaglandinlerin karsinogeneze katkıda bulunduğuna dair hipotez epidemiyolojik ve deneysel kanıtlarla desteklenmektedir. NSAİİ'leri içine alan COX inhibitörleri (dolayısıyla PG oluşumunun inhibitörleri) çeşitli tümörlere karşı korumaktadır. ¹³⁶ NSAİİ'in hayvanlarda kimyasal olarak indüklenmiş dil tümörlerine karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. ^{137,138} Oral lökoplakileri ve baş boyun yassı hücreli karsinomlarını içine alan pek çok premalign ve malign patolojide sıklıkla COX-2 bol miktarda bulunur. ^{139,140} COX-2 seviyeleri baş boyun yassı hücreli karsinomuna komşu, normal görünen mukozada da artmaktadır. ¹³⁹ COX-2 ile karsinogenez arasındaki sebep-etki ilişkisini destekleyen en spesifik veriler genetik çalışmalardan gelir. Bir çalışmada COX-2'nin yok edilmesi farelerde intestinal poliplerin sayısında ve boyutunda önemli derecede azalmaya yol açmıştır. Başka bir çalışmada memelerinde aşırı COX-2 ekspresyonu olan multipar dişi farede metastatik meme kanseri gelişmiş. ¹⁴¹ Pek çok farmakolojik çalışma COX-2'nin gerçek terapötik hedef olduğunu öne sürmektedir. Selektif COX-2 inhibitörleri baş boyun kanserleri de dahil olmak üzere çeşitli deneysel tümörün oluşumunu, büyümesini ve metastazını azaltmıştır. ^{142,143} Shiotani ve ark. ¹⁴² selektif bir COX-2 inhibitörü olan nimesülidin 4-

nitrokinolon-1-oksetin indüklediği dil kanserinin insidansını azalttığını göstermişlerdir. COX-2 inhibitörlerinin baş boyun yassı hücreli karsinomlarının tedavisinde de yararlı olabileceğini gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur.

2.9.2. COX-2'nin Karsinogenezdeki Rolünün Mekanizmaları

COX-2 karsinogenezde önemli birden çok mekanizmayla etki eder.

2.9.2.1. Ksenobiyotik Metabolizma

COX hem peroksidaz hem de siklooksijenaz aktivitesi olan bifonksiyonel bir enzimdir. Peroksidaz aktivitesi prokarsinojenlerin karsinojenlere dönüşmesinde katalizördür. Karaciğerde, bu tür oksidatif reaksiyonlar esas olarak sitokrom P-450 tarafından katalizlenir. Baş boyun gibi ekstrahepatik dokularda sıklıkla düşük konsantrasyonda P-450 mevcuttur ¹⁴⁴, bu nedenle önemli miktarda ksenobiyotik COX'un peroksidaz aktivitesiyle ko-oksidize edilebilir.

Mutajenlerin sentezini katalizleme yanında COX-2 prokarsinojenler tarafından indüklenebilir. Örneğin, tütün dumanında bulunan prokarsinojenlerden benzo[a]piren COX-2 transkripsiyonunu uyarabilir. ¹⁴⁵ COX-2 de benzo[a]piren-7,8-diolün yüksek oranda reaktif ve mutajenik bileşik olan benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksite oksidasyonunu katalizler. ¹⁴⁶ Spekülatif olmasına rağmen bu bulgular tütün dumanı ile ilişkili DNA hasarını önlemede COX-2 inhibitörlerinin potansiyel rolünü gündeme getirmektedir.

2.9.2.2. Apoptosis

Apoptosisin veya programlı hücre ölümünün karsinogenez sırasında azaldığı gözlenir. COX-2'nin epitelyal hücrelerde aşırı ekspresyonu azalmış apoptosise yol açar.¹⁴⁷ Bu etki antiapoptotik protein Bcl-2'nin artan seviyelerine atfedilebilir. Bir çalışmada COX-2'den türeyen bir eikozanoid olan PGE2 ile tedavi, kültür edilen epitel hücrelerinde Bcl-2'yi indüklemiştir.¹⁴⁸ Bir çalışmada COX-2'yi aşırı eksprese eden farelerin meme dokusunda artmış Bcl-2 seviyesi ve proapoptotik protein olan düşük Bax miktarı tespit edilmiş.¹⁴¹ Bu bulgularla uyumlu olarak NSAİİ ve selektif COX-2 inhibitörlerinin çeşitli deneysel sistemlerde apoptosisi indüklediği gösterilmiştir.^{143,147,149} Bu veriler toplandığında, COX-2 ekspresyonu ile programlı hücre ölümü arasında net bir ilişkiyi göstermektedir. Muhtemelen, COX-2'nin upregülasyonu anormal hücrelerin sağ kalımını arttırmaktadır ve böylelikle tümör oluşma riskini arttıran sıralanmış genetik değişikliklerin birikmesine yol açar.

2.9.2.3. İnflamasyon ve İmmüsupresyon

Kronik inflamasyon epitelyal karsinogenez için bilinen bir risk faktörüdür.¹⁵⁰ Sitokin aracılı COX-2 upregülasyonu inflame dokularda prostoglandinlerin sentezinin artmasına katkıda bulunur. Çeşitli tümörlerin oluşması ve büyümesi immüsupresyon ile ilişkilidir.¹⁵¹ Tümör hücreleri tarafından salınan koloni uyarıcı faktörler immün düzenleyici lenfokinlerin üretimini, T hücre ve B hücre proliferasyonunu ve doğal öldürücü hücrelerin sitotoksik aktivitelerini inhibe eder, böylelikle tümör oluşumuna yol açan PGE2 sentezi için monosit ve

makrofajları aktive eder.^{152,153} PGE2 aynı zamanda TNF- α 'yı inhibe eder ve immünsüpresif bir sitokin olan IL-10'unun üretimini indükler.¹⁵⁴ Bir çalışmada in vivo olarak COX-2 ekspresyonunun kesilmesinin IL-10 ve IL-12 dengesini tekrar tesis ederek antitümör reaktivitesini geliştirdiği gösterilmiştir.¹⁵⁵ COX aktivitesi inhibitörlerinin tümör aracılı immünsüpresyonu zayıflattığı gösterilmiştir.^{156,157}

2.9.2.4. Anjiojenez

Tümör kitlesinde önemli derecede artış öncesinde beslenme ve oksijen için vasküleritenin artması gereklidir. Baş boyun yassı hücreli karsinomlarında COX ekspresyonu, VEGF ekspresyonu ve tümör vaskülarizasyonu ile korele bulunmuştur.¹⁴⁰ İnsan dokularındaki bu bulgu daha önceki aşırı COX-2 ekspresyonunun epitelyal hücrelerdeki vasküler büyüme faktörlerini ve kapiller-benzeri ağların üretimini arttırdığına dair verilerle uyumludur.¹⁵⁸

Diğer bazı çalışmalarda da COX-2 ve anjiojenez arasında bağlantı kurulmuştur. Bir çalışmada vahşi-tip veya COX-1 kesilmiş farelerle karşılaştırıldığında COX-2 kesilmiş farelerde tümör büyümesi zayıflamıştır.¹⁵⁹ Bir başka çalışmada selektif COX-2 inhibitörü olan selekoksib rat korneasında fibroblast büyüme faktörünün indüklediği anjiojenezi bloke etmiştir.¹⁶⁰

2.9.2.5. İnvazyon ve Metastaz

Aşırı COX-2 eksprese eden insan kanser hücreleri artan miktarlarda prostoglandin üretirler ve daha invazif hale gelirler.¹⁶¹ Artan invazif özellikle ilişkili biyokimyasal değişiklikler arasında membran-tipi metalloproteinaz-1 için

artan mRNA miktarları ve metalloproteinaz-2'nin aktivasyonu yer alır. Bir çalışmada aşırı COX-2 ekspresyonu hyaluronat için hücre yüzeyi reseptörü olan CD44'ün miktarını arttırmış ve CD44'ün spesifik blokajı tümör hücrelerinin invazif özelliğini önemli derecede düşürmüştür.¹⁶² Bu in vitro bulgularla uyumlu olarak, selektif COX-2 inhibitörlerinin deney hayvanlarında metastazı baskıladığı gözlenmiştir.^{160,163}

2.10. ALOX-12 ve Kanser

Araşidonik asit metabolizması lipooksijenaz yolu boyunca çok çeşitli aktif eikozanoid oluşumuna yol açar. Bu enzimlerin ekspresyonu çeşitli kanserlerin progresyonuna göre değişir ve bu suretle tümör gelişmesini düzenledikleri gösterilmiştir. Lipooksijenazın katalizlediği araşidonik ve linoleik asit metabolizmasının kanser gelişmesindeki fonksiyonel rolü yeterli veri ile desteklenmektedir. Lipooksijenazların farmakolojik ve doğal inhibitörlerinin birkaç deneysel modelde karsinogenezi ve tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir. Farklı ALOX izoformları farklı etkiler göstermektedir. ALOX5 ve platelet tipi ALOX12 genelde prokarsinojenik olarak bilinir, ALOX15-1 tartışmalıdır ve ALOX15-2 karsinogenezi baskılar. Doymamış yağ asiti metabolizmasıyla inflamasyon ve karsinogenez arasındaki fonksiyonel ilişki pekçok moleküler çalışmada geniş olarak çalışılmıştır ve bu sayede pekçok farklı kanserin tedavisi ve ilaçla önlenmesi için potansiyel yeni hedefler gösterilmiştir.^{164,165} Siklooksijenaz, epoksijenaz ve lipooksijenaz olmak üzere üç tip enzim biyolojik olarak aktif eikozanoidleri metabolize edebilir. Bu yolla üretilen çeşitli

lipid peroksidleri ve biyoaktif lipidler hücre çoğalmasını, apoptosisi, değişimi ve yaşlanmayı düzenler. Son dekatta ALOX izoformları ile kanser gelişimi ve ilerlemesi arasındaki fonksiyonel bağlantıyı araştıran çalışmalar yayınlanmıştır.

ALOX12'un üç formu tanımlanmıştır: lökosit formu, platelet formu ve epidermal formu. Platelet tip ALOX12 araşidonik asiti 12(S)-HETE'ye dönüştürürken, lökosit tip ALOX12 araşidonik asiti veya linoleik asiti 12(S)-HETE'ye veya 15(S)-HETE'ye dönüştürür. Hem lökosit tipi hem de platelet tipi melanoma, prostat ve epidermal kanserlerin arasında bulunduğu kanser dokularında bulunabilir. Veriler ALOX12'un hem kanser hem de sağ kalımla ilişkili olduğunu göstermektedir. ¹⁶⁶ ALOX12'un ALOX12 inhibitörleri ile inhibisyonu karsinosarkoma hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmiş ve apoptosisi indüklemiştir. Aynı çalışmada ALOX12 metaboliti olan 12(S)-HETE ALOX12 inhibitörünün indüklediği apoptosisi önlemiştir. ¹⁶⁷ İnsanda tanımlanan çok çeşitli ALOX geninin olmasından dolayı ALOX'un kanser gelişmesine ilerlemesindeki rolü komplekstir. ALOX'un hem insandaki hem de faredaki normal ve kanser epitel dokusundaki ekspresyonunun araştırılması sırasında insan ALOX15-1 ve 2'nin normal dokularda eksprese edilirken mesane, meme, kolon, akciğer ve prostat kanserlerinde eksprese edilmediği bulunmuştur. ¹⁶⁸⁻¹⁷² Buna karşın, ALOX5 ve ALOX12 normal epitelde genelde bulunmaz ve proinflatuar uyarı ile indüklenir. Ayrıca bu enzimler sıklıkla kolon, özofagus, akciğer, prostat ve meme kanserlerinin arasında bulunduğu pekçok kanserde eksprese edilir. ¹⁷³⁻¹⁷⁷

2.11. iNOS ve Kanser

NO L-arjininden oluşur. Reaksiyon nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenir ve moleküler oksijen, NADPH ve kofaktör olarak tetrahidrobiopterin gereklidir. Günümüze kadar NOS'un üç izoform bulunmuş; nöronal (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). nNOS ve eNOS sırasıyla nöronlarda ve endotel hücrelerinde sürekli mevcuttur ve intraselüler Ca^{2+} yükselmesine ihtiyaç duyarlar. Bu izoformlar esas olarak kalsiyum girişi ile düzenlenir ve kısa zaman periyodunda düşük seviyede NO üretirler.¹³⁴ Diğer yandan, iNOS her hücre tipinde sitokinler tarafından indüklenmesi şarttır ve uzun zaman periyodlarında yüksek konsantrasyonlarda NO üretebilirler. NO inflamatuvar yanıt sırasında vasküler fonksiyonda önemli rol oynar. NO güçlü vazokonstriktördür. Vasküler düz kas relaksasyonuna ek olarak, NO'nun inflamasyonda başka önemli görevleri vardır. Platelet agregasyonunu ve adezyonunu azaltır, mast hücrenin indüklediği inflamasyonu bazı yönleriyle inhibe eder ve lökosit toplanması için düzenleyici rol oynar. NO'nun karsinogeneizde hem koruyucu hem de destrüktif etkileri vardır.¹⁷⁸

Bazı çalışmalar kronik inflamasyonda NOS'un aşırı üretiminin genotoksisteye yol açabileceğini vurgulamışlardır. NO DNA lezyonlarına üç muhtemel mekanizmadan biriyle yol açabilir: 1) karsinojenik nitrozaminlerin oluşumu, 2) DNA'nın RNOS tarafından doğrudan modifikasyonu, 3) diğer genotoksik maddeler tarafından oluşturulan DNA lezyonlarının tamiri için gerekli sistemlerin inhibisyonu. Ayrıca, bazı RNOS DNA zincir kırıklarına yol açabilir. Nitrosatif ve oksidatif stresler DNA'da değişik tipte mutasyonlar oluşturabilir.

Nitrozaminler nitrosatif stres ile ilişkili kimyasal aramaddeler tarafından oluşturulabilir ve potansiyel olarak karsinojeniktir. Örneğin, asidik nitrit tarafından oluşturulan RNOS midede bu tür karsinojenik nitrozaminleri oluşturabilir. NO'nun aerobik ortamda bulunması da nitrozamin oluşmasıyla sonuçlanabilir. NO'nun kendisi DNA veya proteinler gibi biyoorganik makromoleküllerle etkileşmez, yüksek konsantrasyondaki NO, N₂O₃ gibi RNOS oluşumuna yol açabilir.

2.11.1. NO ve p53

Normal doku homeostazının devamlılığı hücre proliferasyonu ve ölümünün düzenlenmesiyle sağlanır. Hem eksternal hem de internal uyarılar hücre proliferasyonunu ve apoptosisi başlatabilir veya inhibe eder. Karsinogenez sırasında genetik ve epigenetik lezyonlar displastik ve neoplastik hücrelerde birikir ve büyüme ve ölüm arasındaki dengeyi bozar. Tümör progresyonundaki bu senaryoda karsinogenezin başlangıç olaylarından sonra p53 mutasyonu oluşmaktadır. NO genotoksik ve anjiojenik özellikleri olduğundan mutant p53 taşıyan hücreleri seçebilir. Dahası, mutant p53 hücreleri NO'nun indüklediği apoptosise daha az duyarlı olabilir. Hipoksi veya sitokinler NOS ekspresyonunu indüklerse, sadece fonksiyonel olmayan p53'lü hücre klonları sürekli NO ekspresyonunun genotoksitesini tolere edebilir ve tümör büyümesi desteklenirken büyümenin durdurulmasından ve apoptosisten kaçabilir. NO doğrudan endotelial hücre büyüme uyarısıyla hareket edebilir veya vasküler

endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi diğer anjiojenik faktörlerin ekspresyonunu indükleyebilir.

2.11.2. NO-İlişkili DNA Hasarı

NO önemli bir biyoaktif ajan ve vazodilatasyon, nörotransmisyon ve demir metabolizmasında rolleri olan iletim uyarıcı moleküldür. NO virüslere, bakterilere, mantarlara ve protozoalara karşı sitotoksiktir.^{134,179} Serbest radikal olarak NO oldukça reaktiftir. İntraselüler NO hızlıca nitrit ve nitrat, S-nitroso-tioller veya peroksinitriti oluşturur.^{180,181} NO'nun biyolojik etkileri kısmen peroksinitrit ve NO⁺ gibi NO metabolitleriyle ve peroksinitrit tarafından yapılan protein nitrasyonu ve NO⁺ tarafından yapılan S-nitrolizasyonu önemli sinyal iletimi yollarını modüle edebilir. Fizyolojik etkilerinin yanında NO nitrosatif deaminasyon ile DNA hasarı^{181,182}, NO₂ ile DNA zincir kırılması¹⁸³, peroksinitrit ile oksidatif hasar ve DNA modifikasyonları yapabilir.¹⁸⁴ NO, N-nitrozaminler oluşturarak^{185,186} ve peroksinitrit yoluyla DNA-reaktif lipid peroksidasyon aramaddeleri oluşturarak DNA modifikasyonlarına sebep olabilir.¹⁸⁷ NO ayrıca belirli DNA tamir aktivitelerini inhibe eder.^{188,189}

Karsinogeneze erken dönemlerde perilezyonel inflamasyon görüldüğü iyi bilinmektedir. Mutasyonel olayların NO'nun ve pek çok potansiyel olarak karsinojenik metabolitin inflamatuvar ekspresyonunun redoks DNA hasarı yoluyla meydana gelip gelmediği henüz ispatlanmamıştır. p53 TBG'nin bazı bölgeleri 5-metilsitozinin deaminasyonu yoluyla insan karsinogenezinde NO'ya etiyolojik katkıda bulunabilir.¹⁹⁰ NO'nun p53'te bu genin fonksiyonunu

değiştirecek yapısal değişiklikleri indükleyebildiği bilinmektedir.¹⁹¹ Dahası, başka modellerde NO'nun mutasyonel hasarın önemli bir işaretçisi olabilecek çift-zincir DNA kırıklarını indükleme kabiliyeti olduğu gösterilmiştir.¹⁹²

Kronik inflamasyon sırasında NO'nun toksisitesi iki kimyasal olayla oluşur: 1) NO'nun peroksinitrit ve reaktif nitrojen türevleri olarak bilinen nitrat, nitrit ve N₂O₃ gibi nitrosan türevler oluşturmak için süperoksitle oksidasyonu ve 2) proteinler ve NO arasında nitrolizasyon olayları ile doğrudan reaksiyon.

NO DNA'ya hücreye spesifik olabilecek pekçok mekanizmayla zarar verebilir.¹⁹³ Pürin ve pirimidinlerin nitrozasyonu sitozinin urasile ve guaninin ksantine hidrolitik deaminasyonu ile sonuçlanır.¹⁸² Pürin bazının yerine pirimidin bazının geçmesi veya tersi NO'ya maruz kalan insan hücrelerinde ve çıplak DNA'da gözlemlenen major mutasyonlardır.¹⁹⁴ N₂O₃ karsinojen-N-nitröz bileşikler, DNA zincir kırıkları oluşmasına sebep olan güçlü elektrofilik bir nitröz ajandır. Peroksinitrit de DNA ile doğrudan reaksiyona girebilir ve mutasyonlara ve DNA zincir kırıklarına yol açabilir.¹⁹⁵ Deaminasyonun yanında NO ve/veya peroksinitrit DNA baz oksidasyonu yapabilir.

NO ve reaktif oksijen türevleri DNA'ya doğrudan zarar verebilmelerine rağmen memeli hücreleri genom tamiri için zengin ve kompleks mekanizmalara sahiptir. İnflamasyon sırasında DNA hasarının birikmesi doğrudan hasarın ve efektif olmayan tamirin göstergesidir. Malesef DNA tamir enzimleri de NO ve reaktif oksijen türevlerinin hedeflerinden gibi görünmektedir.^{189,196} Böylelikle iNOS'un oluşturduğu NO hem DNA hasarı yapabilir hem de tamir mekanizmasını

inhibe edebilir. NO'nun ve metabolitlerinin bu etkisi NO'yu kanseri inflamasyona bağlayan en önemli medyatörler arasına sokmaktadır.

DNA hasarını onarma yanında organizma hücresel dönüşüme karşı programlı hücre ölümü gibi bir başka koruyucu mekanizması vardır. Onarılamayan DNA hasarı apoptosisin güçlü bir indükleyicisidir. NO birkaç aşamada apoptosisi inhibe ederek DNA-hasarlı hücrenin sağ kalımını sağlar.

2.12. Real-Time Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

1988 yılında “*Thermus aquaticus*” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile DNA zincirinin istenilen bir bölgesini çoğaltmak, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir buluştur. Son yıllarda PCR’da sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler – ısı döngü cihazı) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Realtime PCR teknolojisi ilk defa Higuchi ve arkadaşları tarafından 1993 yılında geliştirilmiştir.¹⁹⁷ Real-time PCR, nükleik asit amplifikasyonunun floresan boyalar kullanılarak eş zamanlı (real-time) olarak izlenildiği bir yöntemdir. Yöntem için özel tespit sistemine sahip bir PCR cihazı gerekmektedir. Gen ekspresyonunun analizini değiştiren bu metod ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. Ekstra görüntülemeye gerek duyulmaması, nitelik ve nicelik yönünden kısa sürede çok sayıda örneği analiz edebilmesi, sonuçların kantitatif olarak verilmesi, dizilemeye gerek kalmadan tek nükleotid farklılıklarının saptanabilmesi, genotiplendirme yapılabilmesi, tüpte

uygulandığı için kontaminasyon riskini en aza indirmesi yöntemin avantajları arasındadır. Ayrıca ürün analizi için agaroz jel elektroforezi ve DNA veya RNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi basamakları ortadan kaldırmaktadır.¹⁹⁸ Bu özellikleri göz önüne alındığında, Real-time PCR; gen ekspresyonunun ölçümü, genotipleme analizi, kanser genetiği, kromozomlardaki sayısal ve yapısal bozuklukların (mutasyon) analizi, infeksiyon hastalıklarının tanısı ve tedavi takibi, DNA hasarının belirlenmesi (mikrosatellit instabilitesi), epigenetik araştırmaları (metilasyon belirlenmesi), kemik iliği transplantasyonu sonrası minimal rezidüel hastalık (MRD) ve kimerizmin izlenmesi, anne karnından izole edilen tek hücreden prenatal tanı, hemoglobinopatilerin prenatal tanısı gibi giderek artan kullanım alanları ile mikrobiyoloji ve moleküler genetik laboratuvarlarında yaygın olarak tercih edilmektedir.¹⁹⁸

Bu sistemin geliştirilmesinde çeşitli kimyasallar kullanılmıştır. Bunların arasında DNA çift zincirine bağlanan, diziye özgün olmayan floresan boyalar (Etidyum bromür, SYBR Green I) ve diziye özgün çeşitli floresan işaretli problemler (TaqMan prob, Hibridizasyon problemleri, moleküler beacon'lar, scorpion primerleri, Light-up prob, Sunrise prob) bulunur.¹⁹⁹

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Laboratuvar Cihazları ve Gereçler

- Hassas terazi (AND-ER-182A, Japonya)
- Spin vorteks (Biosan, Rusya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan, Rusya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Soğutmalı santrifuj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD)
- pH metre (WTW 422, Almanya)
- Mikropipetler (10 µL, 100 µL, 100 µL) (CLP, ABD)
- Derin dondurucu (-86⁰C) (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu (-30⁰C) (Sanyo, Japonya)
- Güvenlik kabini (VFRS 1206 E, Danimarka)
- Azot tankı (GT212 EINOX Air liquide, Fransa)
- Thermal Cyclers (Hybaid PCR-sprint, Thermo electron corp., ABD)
- LightCycler Real-time PCR cihazı (Roche, Almanya)
- Filtreli mikropipet uçları (CLP, ABD)
- Steril enjektör (2ml) (Ayset, Türkiye)
- Steril enjektör (5ml) (Medplast-S, Türkiye)
- Steril enjektör (10ml) (Hayat, Türkiye)
- 0.2-0.5-1.5 µl'lik ependorf tüpler (CLP, ABD)

• 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris-HCL (Sigma, ABD)
- KCl (Sigma, ABD)
- MgCl₂ (Fermantas, ABD)
- EDTA (Etilendiamintetraasetikasit disodyum dihidrat) (Sigma, ABD)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı, Türkiye)
- Steril dH₂O (Eczacıbaşı, Türkiye)
- DEPC'li (Dietilpirokarbonat) su (Biological Industries, İsrail)
- Kloroform (Amresco, ABD)
- İzopropanol (Amresco, ABD)
- Saf etanol (Carlo Erba, İtalya)
- DNaz I recombinant (Roche, Almanya)
- TaqMan Master Mix (Roche, Almanya)
- Bölgeye özgü primerler (COX-2, iNOS, ALOX-12 ve GAPDH) (Tıbbolbiol, Almanya)
- Bölgeye özgü LNA prob (UPL prob 23, COX-2 için) (UPL, Almanya)
- Bölgeye özgü LNA prob (UPL prob 16, iNOS için) (UPL, Almanya)
- Bölgeye özgü LNA prob (UPL prob 83, ALOX-12 ve HPRT için) (UPL, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Kitler

- peqGOLD TriFast™ Dokudan RNA izolasyon kiti (Pepqlab, Erlangen, Almanya)
- Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Almanya)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hastalar ve Örnekler

Çalışma grubu 22 hastadan oluştu. Üç kadın 19 erkek hasta mevcuttu. Hastaların yaşları 37 ile 71 yaş arasında değişmekteydi ve yaş ortalaması 56.4 olarak hesaplandı. Hastaların tamamının tanısı histopatolojik olarak kondu ve yassı hücreli karsinomdu. Hastaların yassı hücreli karsinomlarının yerleşim bölgelerinin dağılımı şu şekildeydi; larenks 13 hasta, oral kavite 2 hasta, 4 hipofarenks, 2 orofarenks, 1 alt dudak. Hastalardan tümör dokuları ya major cerrahi sırasında ya da insizyonel biyopsi sırasında elde edildi. Kontrol grubunu tümör dokuları alınan hastaların komşu tümörsüz bölgelerinden alınan dokular oluşturdu. Hastalardan hem tümör hem de kontrol dokusu olarak yaklaşık 5x5 mm boyutlarında parçalar elde edildi. Hastalardan elde edilen tümör ve kontrol dokuları steril bir şekilde ependorf tüplere yerleştirildi. Ependorf tüpler hemen sıvı azot içine atıldı ve bu şekilde transfer sağlandı. Dokular ependorf tüpler içinde çalışma saatine kadar -80 °C’de saklandı.

3.2.2. Kanser Dokusundan Total RNA Saflaştırılması

Hastalara ait doku örnekleri steril bir şekilde alındıktan sonra steril petri kabında serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50mg-100mg) büyüklüklerde bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNaz ve RNaz içermeyen steril 1.5 ml’lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. Dokular analiz edilene kadar - 80°C’ de saklandı.

Doku örneklerinden RNA izolasyonu işlemi, peqGOLD TriFast™ dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile işlemler güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirildi:

- 1- 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle ile homojenize edildi.
- 2- Homojenat üzerine 1000 mikrolitre (μ l) TriFast eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 3- 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 4- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), ara faz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 5- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
- 6- Örnekler 1.5 saat -20°C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
- 7- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 μ l DNaz (μ g başına 5U DNaz), 300 μ l DNaz Buffer I ve 400 μ l DEPC'li su eklenerek 30 dk 37°C sıcaklıkta bekletildi.
- 8- Örneklerin üzerine 300 μ l 25mM EDTA eklendi ve 65°C'de 10 dk bekletildi.
- 9- 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 10- 1000 μ l %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst sıvı atıldı.

- 11- Peletin üzerine tekrar 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 12- Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.3. cDNA Sentez Tepkimesi

Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de [RNA için 260 nanometre'de (nm); protein için 280 nm] ölçülerek nanogram/mikrolitre (ng/µl) miktarları ve saflıkları belirlendi. Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. RT-PCR tepkime karışımı

Son konsantrasyon		Hacim
Steril H ₂ O-PCR Grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random Hegzamerler	60 µM	2 µl
RNaz İnhibitörü	20 ünite (U)	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 U	0.5 µl
Total RNA	2 µg	2 µg

3.2.3.1. RT-PCR Programı

Otomatik ısı döngü cihazı Tablo 2’de belirtilen programa ayarlanarak RNA’lardan cDNA elde edildi. Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-time PCR’da kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Tablo 2. RT-PCR tepkime programı

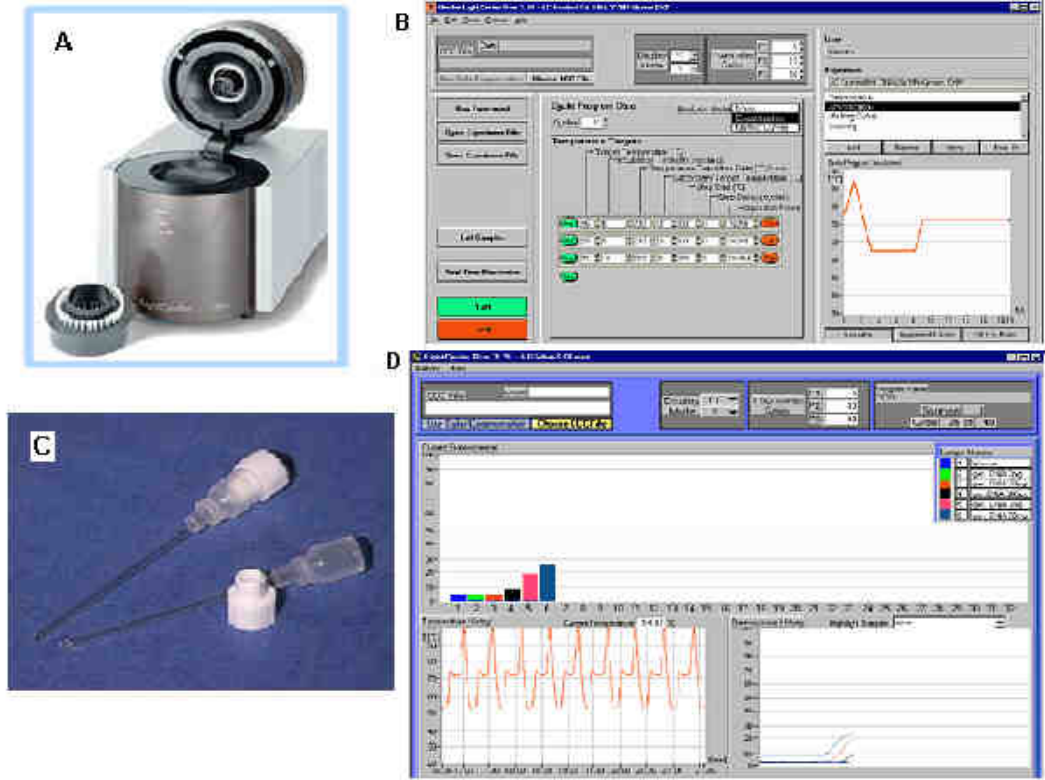
	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters Transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

3.2.4. COX-2, ALOX12 ve iNOS Genlerinin Ekspresyon

Düzeylerinin Real-time PCR ile Değerlendirilmesi

COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ekspresyonunun kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler™ (LC) cihazı kullanıldı (Resim 1). Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LightCycler TaqMan Master mix kullanılarak gerçekleştirildi. COX-2, iNOS ve ALOX-12 gen ekspresyonunu normalize etmek

için elde edilen cDNA örnekleri, HPRT genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak çalışıldı.

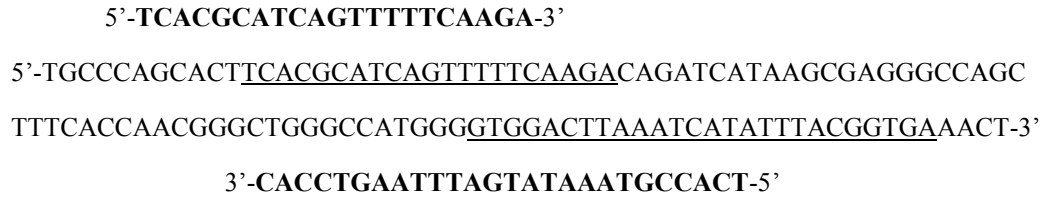


A: Real Time PCR cihazı, B: PCR tepkimesi için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayısının bilgisayar ortamında girildiği program sayfası, C: PCR tepkimesi için hazırlanan karışımın konulduğu, cam malzemeden üretilmiş kapiller, D: Tepkime sırasında örneklerin durumunu grafik ve logaritmik eğri olarak gösteren program sayfası

Resim 1. Real Time PCR tepkimesi için kullanılan LC cihazına ait görüntüler.

3.2.4.1. COX-2 Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 3’de gösterilen primerler ile LC TaqMan Master karışımı, UPL prob 23 ve COX-2 mRNA’sından elde edilen cDNA’lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 3’de verilmiştir.



Şekil 3. COX-2 mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; AY462100.1, Homo sapiens cyclooxygenase 2 (COX2) mRNA, complete cds.]

Tablo 3. COX-2 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	5.8 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
COX-2 PrimerF (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
COX-2 PrimerR (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
LC TaqMan Master karışımı	1x	1 µl
UPL prob 23 (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
Cdna	-	1 µl

3.2.4.2. ALOX12 Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 4 'de gösterilen primerler ile LC TaqMan Master karışımı, UPL prob 83 ve ALOX12 mRNA'sından elde edilen cDNA'lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 4'de verilmiştir.

5'-CCAGTATCACTTGCTGAACACG-3'

5'-TCAGATTTCCAACTGCACGAGATCCAGTATCACTTGCTGAACACGCACCTGGTGGCTGAGGTCATCGCTGTCGCCACCATGCGGTGCCTCCCAGGACTGCACCCCATCTTCAAGTTCCTGATCCCCCATATCCGCTACACCATGGAAATCAACACCCGGGC-3'

3'-TTCAAGGACTAGGGGGTATAG-5'

Şekil 4 . ALOX12 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; NM_000697.1 Homo sapiens arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12), mRNA.]

Tablo 4. ALOX12 Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	5.8 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
ALOX12 PrimerF (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
ALOX12 PrimerR (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
LC TaqMan Master karışımı	1x	1 µl
UPL prob 83 (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
cDNA	-	1 µl

3.2.4.3. iNOS Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 5’da gösterilen primerler ile LC TaqMan Master karışımı, UPL prob 16 ve iNOS mRNA’sından elde edilen cDNA’lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 5’de verilmiştir.

5’-TCCTGGTTTGACTGTCCTTACC-3’

**5’-CAGGTCTCTTCCTGGTTTGACTGTCCTTACCCCGGGGAGGCAGTGCAGCCAGC
TGCAAGCCCCACAGTGAAGAACATCTGAGCTCAAATCCAGATAAGTGACATAAGT-3’**

3’-GTCACCTTCTGTAGACTCGAGTT-5’

Şekil 5. iNOS mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; ENST00000379105.1, Nitric oxide synthase, inducible (NOS type II)]

Tablo 5. iNOS Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	5.8 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
iNOS PrimerF (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
iNOS PrimerR (10 pmol/µl)	4 pmol	0.5 µl
LC TaqMan Master karışımı	1x	1 µl
UPL prob 16 (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
cDNA	-	1 µl

3.2.4.4. HPRT Geninin Ekspresyon Düzeyinin Kantitatif Analizi

Şekil 6’de gösterilen primerler ile LC TaqMan Master karışımı, UPL prob 83 ve HPRT mRNA’sından elde edilen cDNA’lar kullanılarak LC cihazında Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi. Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler ve oranları Tablo 6’da verilmiştir.

5’-AACCTCCTCTTGCCTGCTG-3’

**5’-GCATAAACCTCCTCTTGCCTGCTGCCCTCCTCAAAGACCTCCCTCCCTCCTTCACT
GCCCTTCTGCTCCTGGAGAGCCACCCTCTCTCCATTATCCTTCCTATCAGCTTCA-3’**

3’-TCTCGGTGGGAGAGAGGTAA-5’

Şekil 6. HPRT mRNA’sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve bunların cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi. [Referans dizi; M26434.1, Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene, complete cds.]

Tablo 6. HPRT Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH₂O	-	5.8 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µl
HPRT PrimerF (10 pmol/µl)	10 pmol	0.5 µl
HPRT PrimerR (10 pmol/µl)	10 pmol	0.5 µl
LC TaqMan Master karışımı	1x	1 µl
UPL prob 86 (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µl
cDNA	-	1 µl

Real-time PCR karışımı hazırlandıktan sonra karışım kapiller tüplere dağıtıldı ve en son üzerine cDNA eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm’de 10 sn santrifüj edildi. Daha sonra LC cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. COX-2, ALOX12, iNOS, ve HPRT için aynı PCR programı kullanılmıştır

3.2.4.5. COX-2, ALOX12, iNOS ve HPRT Light-Cycler Deney Programı

Program 1 - Ayrılma (Denatürasyon)		
Döngü	1	
Analiz	-	
Hedef Sıcaklık	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon Süresi (s:dk:sn)	10.0	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2 – Primer Bağlanması ve Uzama		
Döngü	50	
Analiz	Çoğalma	
Hedef Sıcaklık	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon süresi (s:dk:sn)	10	20
Sıcaklık Değişim Hızı (°C/sn)	20.0	20.0
Program 3 – Soğutma		
Döngü	1	
Analiz	-	
Hedef Sıcaklıklar	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon Süresi (s:dk:sn)	30	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Reaksiyon sonucu her bir bireye ait COX-2, ALOX12, iNOS ve HPRT genlerinin mRNA ekspresyon düzeyini gösteren *threshold cycle* (Ct) değerleri belirlendi. COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ekspresyon düzeyleri HPRT geninin ekspresyon düzeyi referans alınarak normalize edildi.

4. BULGULAR

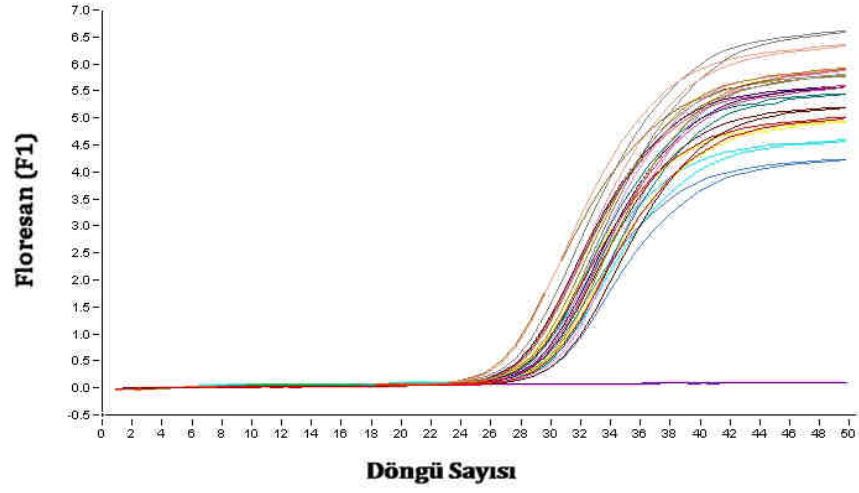
Bu çalışmada baş boyun kanser dokusunda COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında 22 hastaya ait kanser dokusu ile kontrol amaçlı olarak aynı bireylerin komşu sağlam mukozaları kullanılmıştır.

COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ekspresyonunun Real-time PCR ile ölçümü için Light Cycler™ cihazı kullanıldı. COX-2, ALOX12 ve iNOS gen ekspresyonunu normalize etmek için hasta ve kontrol gruplarına ait her bir cDNA örneği, HPRT genine özgü primerler ile LC TaqMan Master karışımı kullanılarak çalışıldı. Relatif gen ekspresyonunun istatistiksel sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir ⁷¹.

$$R = \frac{E(\text{hedef})^{\Delta Ct(\text{kontrol} - \text{hasta})}}{E(\text{referans})^{\Delta Ct(\text{kontrol} - \text{hasta})}}$$

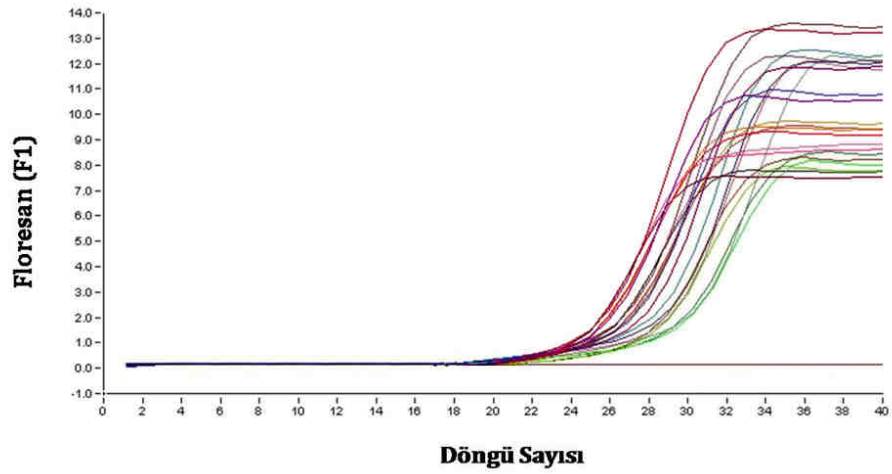
Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini ifade etmektedir. ΔCt değeri kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı gösterirken, R değeri ise ekspresyon oranını göstermektedir. Ct, tepkime sırasında oluşan floresans ışımının eşik değerini geçtiği andaki siklus sayısını ifade eder. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır.

Gen ekspresyonunun Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan referans HPRT geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 7’de gösterilmiştir.



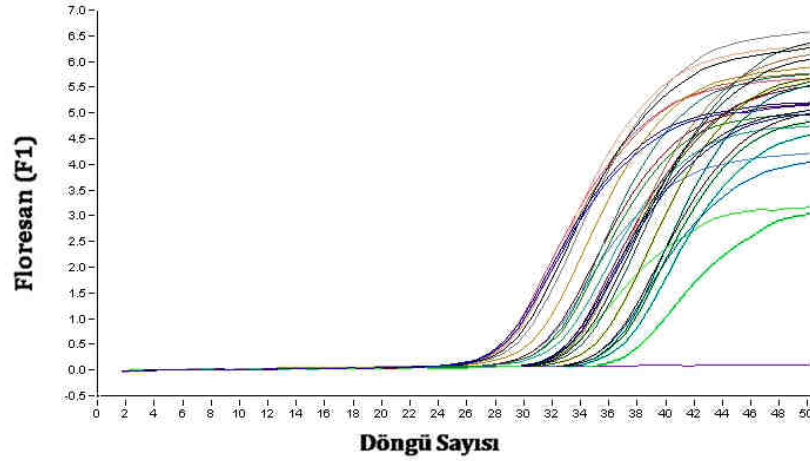
Şekil 7. Hasta ve kontrol dokularında HPRT geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.

COX-2 genine ait mRNA ekspresyonunu gösteren amplifikasyon eğrisi Şekil 8’da gösterilmiştir.



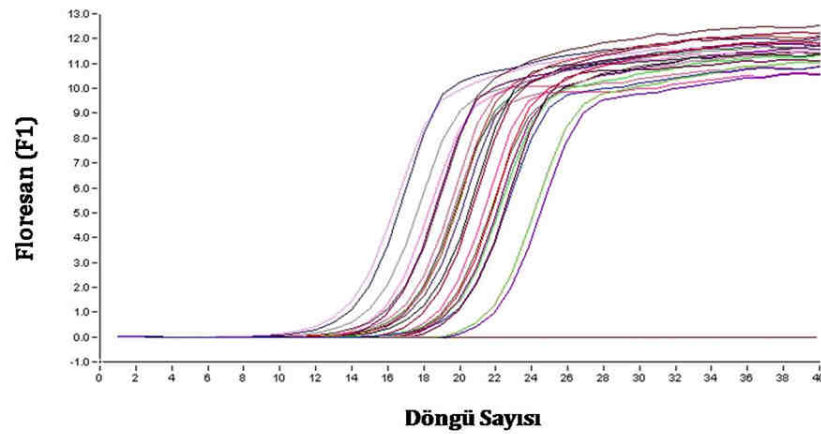
Şekil 8. Hasta ve kontrol dokularında COX-2 geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.

ALOX12 genine ait mRNA ekspresyonunu gösteren amplifikasyon eğrisi
Şekil 9’da gösterilmiştir.



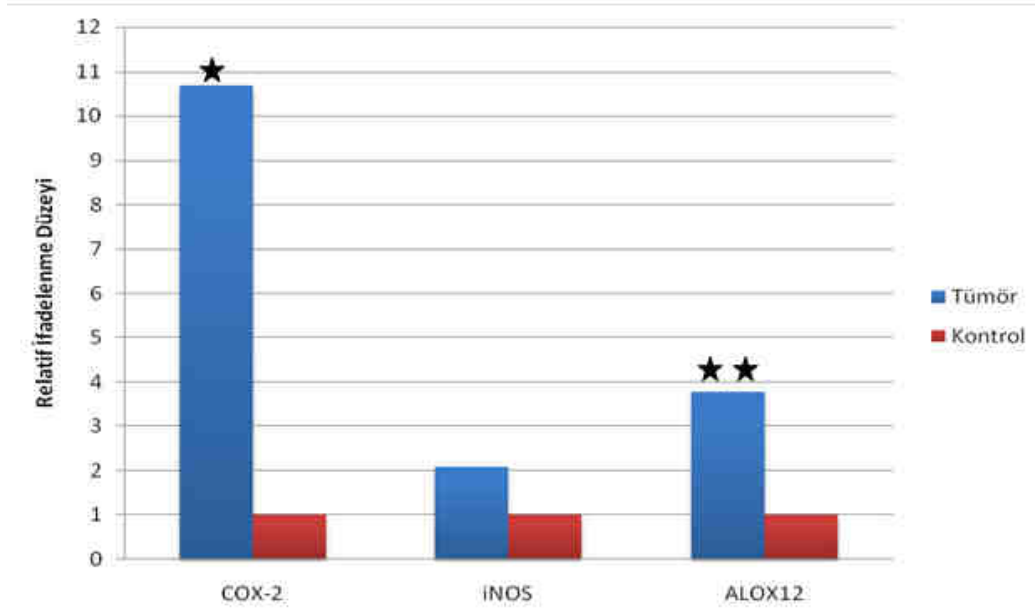
Şekil 9. Hasta ve kontrol dokularında ALOX12 geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.

iNOS genine ait mRNA ekspresyonunu gösteren amplifikasyon eğrisi
Şekil 10’de gösterilmiştir.



Şekil 10.Hasta ve kontrol dokularında iNOS geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunu gösteren Real-time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.

Tüm hastalara ait tümör dokuları ile sağlıklı kontrol dokuları karşılaştırıldığında COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin ekspresyon miktarlarında artış olduğu bulunmuştur (Grafik 1).



* : COX-2'nin tüm tümör dokularındaki artışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,001).

** : ALOX12'nin tüm tümör dokularındaki artışı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (p=0,011).

Şekil 11. Tüm hastalara ait tümör ve sağlıklı kontrol dokularındaki COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri. Genlerin kontrol dokusundaki ekspresyon düzeyi 1 birim kabul edilerek, kanser dokusundaki değişimleri gösterilmiştir.

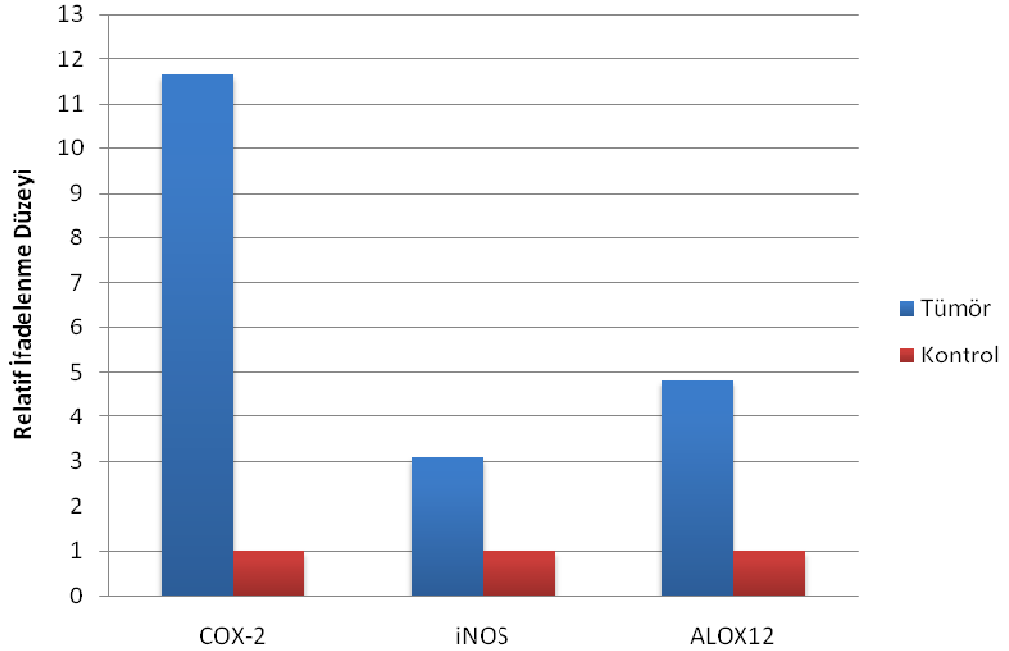
Tüm hastaların tümör dokularında COX-2 gen ekspresyon miktarında gözlenen yaklaşık 11 katlık artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir (p = 0,001). Ayrıca ALOX12 geninin ekspresyon miktarına bakıldığında tüm tümör dokuları için belirlenen yaklaşık 4 katlık artmanın da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir (p = 0,011). Buna karşın iNOS

geninin transkripsiyonundaki 2 katlık artışın, tüm tümör dokuları ile sağlıklı kontrol dokuları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p = 0.286$) (Tablo 7).

Tablo 7. Tüm tümör örnekleri ve sağlıklı kontrol dokularında araştırılan genlerin ekspresyon seviyesine ilişkin istatistiksel veri (n=22).

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	P değeri
HPRT	1.000	0,608 - 1,596	0,391 - 2,552	1,000
COX-2	11,644	4.262 – 28,646	2,538 – 39,993	0.001
iNOS	3,084	1,689 - 6,229	1,054 - 10,656	0,041
ALOX12	4,813	2,482 - 10,749	1,863 - 20,511	0,008

Larenks kanserlerinde, COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin mRNA seviyelerinin kontrol dokularına kıyasla artış olduğu bulunmuştur. (Şekil 12)



Şekil 12. Larenks kanserlerinde ve sağlıklı kontrol dokularındaki COX-2, iNOS ve ALOX12 genlerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.

Genlerin kontrol dokusundaki ekspresyon düzeyi 1 birim kabul edilerek, kanser dokusundaki değişimleri gösterilmiştir. Tümör dokularında her üç genin ekspresyon miktarında gözlenen artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur ($P < 0,05$).

Larenks kanserlerinde, COX-2 gen ekspresyon miktarında gözlenen 11,6 katlık artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P = 0,001$). iNOS geninin ekspresyon miktarının kontrol dokularına kıyasla B1 tümör dokularında 3 kat arttığı belirlenmiştir ($P = 0,041$). ALOX12 geninin ekspresyon miktarında da B1 tümörler için belirlenen yaklaşık 5 katlık artmanın da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P = 0,008$) (Tablo 8).

Tablo 8. Larenks için tümör ve sağlıklı kontrol dokusunda araştırılan genlerin ekspresyon seviyesine ilişkin istatistiksel veri (n=13 hasta).

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	%95 Güven Aralığı	P değeri
HPRT	1.000	0,608 - 1,596	0,391 - 2,552	1,000
COX-2	11,644	4.262 – 28,646	2,538 – 39,993	0.001
iNOS	3,084	1,689 - 6,229	1,054 - 10,656	0,041
ALOX12	4,813	2,482 - 10,749	1,863 - 20,511	0,008

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnflamasyon ve kanser arasındaki bağlantı yaklaşık 150 yıl önce farkedilmiş. 1863'te Virchow kanserlerin kronik inflamasyon bölgelerinde oluşma eğiliminde olduğunu göstermiştir.²⁰⁰ Epidemiyolojik çalışmalar kronik inflamasyonun artmış kanser riskiyle ilişkisini desteklemektedir.^{112,200,201}

İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişkiye yönelik araştırmalar öncelikle lökositler gibi inflamatuvar hücreler tarafından üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin mutajenik saldırı yapıp yapmadığı ve tümörün başlamasıyla sonuçlanıp sonuçlanmadığına yönelik olmuştur.¹¹¹ Günümüzde inflamasyondan kanser gelişmesinin inflamatuvar hücreler ile beraber sitokinler, kemokinler ve enzimleri içeren medyatörler tarafından oluşturulan süreç olabileceğinin farkına varılmıştır.¹¹² Bu konak yanıtı tümörleri baskılayabilmesine rağmen, birçok sinyal yoluyla kanser gelişimini hızlandırabilir.¹¹³

Biyoaktif lipidleri oluşturan eikozanoid metabolizması kanser oluşmasına yol açtığı bilinmektedir.^{122,202} Baş boyun kanserlerinin de içinde bulunduğu insanda görülen malignensilerin çoğu köken aldıkları normal dokudan daha fazla oranda prostoglandin üretirler.²⁰³⁻²⁰⁶ Prostoglandinlerin dönüşmüş hücrelerdeki ve tümörlerdeki artmış sentezi artmış COX-2 ekspresyonunun sonucu olabilir. Prostoglandinlerin hücre proliferasyonuna, anjiojeneze, immüniteye ve apoptosise etkilerinden dolayı kanser patogenezinde önemli olabileceklerine inanılmaktadır. Prostoglandinlerin karsinogeneze katkıda bulunduğuna dair hipotez epidemiyolojik ve deneysel kanıtlarla desteklenmektedir. COX ve ALOX yolaklarının metabolitlerinin baş boyun kanserli hastaların tümör dokularında,

plazmalarında ve tükürüklerinde arttığı bulunmuştur. ^{204,207-209} Ayrıca, çeşitli enzimlerin değişmiş ekspresyonları ve araşidonik asit metabolizmasıyla ilişkili genlerin yassı hücreli kanser oluşmasına katkıda bulunduğu bilinmektedir.

COX-2 ile baş boyun yassı hücreli kanserlerini bağlayan birkaç farklı mekanizma vardır. COX-2'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olarak artan PG sentezi hücre proliferasyonunu arttırabilir ¹⁴⁸, anjiyogenez destekleyebilir ²¹⁰, immüniteyi baskılayabilir ²¹¹ ve apoptosisi inhibe edebilir. ¹⁴⁷ COX-2 ayrıca ksenobiyotikleri karsinojenik olan reaktif elektrofillere dönüştürerek aktive eder. Örneğin, tütünde bulunan ve prokarsinojen olan benzo[a]piren-7,8-diolün yüksek oranda reaktif ve mutajenik bileşik olan benzo[a]piren-7,8-diol-9,10-epoksite oksidasyonunu katalizler. ¹⁴⁶

Pekçok premalign ve malign hastalıkta COX-2'nin yükseldiği gösterilmiştir. ¹³⁶ Mestre ve ark.'nın baş boyun kanserli 15 hastadan oluşan bir çalışmada normal mukoza ile karşılaştırıldığında baş boyun kanserli hastalarda tüm bölgelerde 100 kat daha fazla COX-2 mRNA ekspresyonu saptanmıştır. ²¹² COX-2'nin selektif inhibitörlerinin baş boyun kanserlerinin de dahil olduğu pekçok deneysel tümörün oluşumunu, büyümesini ve metastazını azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. ^{136,142,143} Dong ve ark.'nın 85 larenks kanserli hastadan oluşan çalışmada COX-2 ekspresyonunun anlamlı olarak yükseldiği saptanmıştır. ²¹³ Gallo ve ark. 35 baş boyun kanserli hastada COX-2 ekspresyonunu ve PGE2 üretimini analiz ederek baş boyun kanserlerinde COX-2 yolağını araştırmışlar ve komşu normal doku ile karşılaştırıldığında baş boyun kanserli dokularda COX-2'nin aşırı ekspresyonu saptanmış. ¹⁴⁰ Yirmi dört baş

boyun kanserli hastadan oluşan bir çalışmada baş boyun kanser dokularında COX-2 ekspresyonunun kontrol mukozayla karşılaştırıldığında tüm bölgelerde en az 150 kat arttığı gösterilmiştir.¹³⁹ Oral yassı hücreli kanserli 27 hastadan oluşan bir çalışmada COX-2 mRNA ekspresyonu normal komşu dokuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuş.²¹⁴ Yirmi üç hipofarenks kanserli hastadan oluşan bir çalışmada 20 hastada COX-2 mRNA ekspresyonu saptanmış. Pandey ve ark. tarafından düzenlenen prospektif kontrollü çalışmada 42 oral yassı hücreli karsinom olgusu, 13 premalign oral lezyon ve 32 oral mukoza RT-PCR kullanılarak COX-2 ekspresyonu açısından değerlendirilmiş ve premalign lezyonlarla ve normal mukozayla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek COX-2 ekspresyonu tespit edilmiş.²¹⁵ Bu çalışmada tüm hastaların tümör dokularında normal kontroller ile karşılaştırıldığında COX-2 gen ekspresyon miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ve bu bulgu literatür ile uyumludur.

Lipoksijenazlar araşidonik asiti biyolojik olarak aktif metabolitlere metabolize eden enzim ailesini oluştururlar.²¹⁶ Lipoksijenazlar araşidonat 5, 8, 12, 15-lipoksijenaz şeklinde ayrılırlar. (ALOX5, ALOX8, ALOX12, ALOX15) Tümör gelişmesine karşı harekete geçen lökosit veya makrofajların inflamatuvar reaksiyonları sonucu lipid peroksidasyon ürünleri salınabilir. Bu rnler DNA ile doğrudan etkileřebilir²¹⁷ ve DNA hasarına neden olabilir.²¹⁸ Sikloksijenaz ve lipoksijenaz yolaklarından çıkan lipid peroksidasyon ürünleri tümör ilerlemesinde veya tümör metastazında rol oynayabilir.^{219,220}

ALOX12'nin insanlarda kanseri düzenlediğine dair kanıtlar vardır. ALOX12 yoluyla üretilen 12(S)-HETE'nin pekçok kanserle güçlü ilişkisi olduğu

ispatlanmıştır.²²¹ Meme, kolorektal ve prostat tümörlerini içine alan pek çok tümörde ALOX12 aşırı eksprese edilmektedir.²²²⁻²²⁴ 12-HETE tümör ve endotel hücrelerinde integrin ekspresyonunu indükleyebilir ve genelde metastaz, proteoliz, invazyon ve anjiyogenezin çeşitli aşamalarında rol alır.²²⁵ 12(S)-HETE'nin tümör dokusu seviyeleri tümörün invazif özelliği ile ilişkili bulunmuştur.^{225,226}

12-HETE'nin baş boyun kanserlerindeki rolü yeteri kadar araştırılmamıştır. Bir çalışmada oral yassı hücreli karsinomlu hastaların tükürüğünün ve primer tümör dokusu örneklerinin analizi 12-HETE, 5-HETE VE 15-HETE seviyelerinin anlamlı olarak yükseldiğini göstermiştir.^{207,227} ALOX12'nin ALOX12 inhibitörleri ile inhibisyonu karsinosarkoma hücrelerinde proliferasyonu inhibe etmiş ve apoptosisi indüklemiştir. Aynı çalışmada ALOX12 metaboliti olan 12(S)-HETE ALOX12 inhibitörünün indüklediği apoptosisi önlemiştir.¹⁶⁷ Yapılan çalışmalar NSAİİ'nin baş boyun kanserlerinde down-regüle olan ALOX15-1 ve ALOX15-2 izoenzimlerinin artışına sebep olduğu saptanmış. Bu etkilere hücre proliferasyonu ve apoptosisi indüksiyonu eşlik etmiş.²²⁸ Bu çalışmada tüm hastaların tümör dokularında ALOX12 geninin ekspresyon miktarına bakıldığında kontrol dokularla karşılaştırıldığında tüm tümör dokuları için anlamlı olarak yükseldiği belirlenmiştir.

NO, L-arjininden NOS tarafından katalizlenen bir reaksiyonla oluşur. NOS'un bilinen üç izoformu mevcuttur; nöronal (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ve indüklenabilir NOS (iNOS). nNOS ve eNOS kısa zaman periyodunda düşük seviyede NO üretirler ve kalmodulin varlığında sitoplazmik kalsiyumun artışı ile

hızla aktive olurlar. iNOS uzun zaman periyodlarında yüksek konsantrasyonlarda NO üretebilir. Sitokinler (interferon gama, tümör nekroz faktörü) ve diğer ajanlar tarafından aktive edilir; intraselüler kalsiyum artışına ihtiyaç duymaz.¹³⁴ NOS bir defa indüklendiğinde çözünebilen guanilat siklazı aktive eden ve uzamış düz kas relaksasyonuna, vazokonstriktörlere azalmış yanıt ve muhtemelen doku hasarına yol açan devamlı NO üretir.²²⁹

NO vücutta vazodilatasyon, yara iyileşmesinin düzenlemesi, enfeksiyona spesifik olmayan immün yanıt, konak savunması ve sitotoksisite gibi pek çok kritik role sahiptir.²³⁰ NO inflamatuvar yanıtta vasküler fonksiyonda önemli rol oynar. NO potent bir vazodilatatördür. İnflamasyonda vasküler düz kas relaksasyonu yanında diğer önemli görevleri vardır. Platelet agregasyonu ve adezyonunu azaltır, mast hücrelerinin indüklediği inflamasyonu bazı yönleriyle inhibe eder ve lökosit toplanmasında düzenleyici role sahiptir.²²⁹

NO miktarına ve üretildiği şartlara göre hem yararlı ve hem de zararlı etkileri vardır ki bu nedenle NO için “iki –kenarlı kılıç” terimi kullanılır.¹³⁴ Esasında, makrofajlardan salınan NO’nun tümör hücrelerinde hücresel ölümü ilerlettiği iyi bilinmektedir.²³¹ Dahası, yapılan bir çalışmada iNOS geniyle enfekte olmuş tümöral hücrelerin sadece kendi ölümleri için yetecek miktarda değil aynı zamanda diğer hücrelerde sitotoksisite ve apoptosisi indükleyecek miktarda NO ürettikleri gösterilmiştir.²³² NO’nun DNA hasarı ve DNA sentezi inhibisyonu, mitokondriyal aktivite inhibisyonu ve demir-içerikli enzim inhibisyonunu kapsayan çeşitli mekanizmalarla tümörisidal özelliklerinin olduğu bilinmesine rağmen tümör progresyonu ve yayılmasıyla ilişkisi üzerinde durulmaktadır.²³³

NO'nun solid tümörlerin büyümesinde ve metastazında etkili olduğu bilinmektedir. NO'nun hem tümörü ilerletici hem de tümörü inhibe edici etkileri olduğu için bu alan biraz karmaşıktır. NOS insan kolorektal adenokarsinomlar, serviks karsinomu, jinekolojik neoplazmlar, baş boyun yassı hücreli karsinomları, santral sinir sistemi tümörleri ve hepatoselüler karsinom gibi neoplazmlarında tümör hücrelerinde tanınmıştır. ²³⁴ NO'nun spesifik etkisi muhtemelen lokal konsantrasyonlarına bağlıdır ve mevcut veriler pekçok kanserde NO'nun anjiogenezi arttırdığını ve tümörün büyümesini kolaylaştırıldığını göstermektedir. ^{235,236} Deneysel çalışmalar yüksek NOS aktivitesi olan tümörlerin in vivo olarak daha hızlı büyüdüğünü göstermektedir. ²³⁷ NO tümör proliferasyonundan üçlü etkiyle sorumlu olabilir; 1) tümör vaskülarizasyonu ve anjiyojenezi ilerleterek, 2) tümör hücresinin endotel hücrelerine adezyonunu kolaylaştırarak, 3) vasküler permeabiliteyi arttırarak. Bu etkilerin hepsi primer tümörün hızlı büyümesini kolaylaştırabilir. ²³⁸

Serbest radikal olarak NO oldukça reaktiftir. İntraselüler NO hızlıca nitrit ve nitrat, S-nitroso-tioller veya peroksinitriti oluşturur. ^{180,181} NO'nun biyolojik etkileri kısmen peroksinitrit ve NO⁺ gibi NO metabolitlerindendir. NO genotoksik ve anjiogenik özellikleri olduğundan mutant p53 taşıyan hücreleri seçebilir ve mutant p53 hücreleri NO'nun indüklediği apoptosise daha az duyarlı olabilir. Bazı çalışmalar kronik inflamasyonda NOS'un aşırı üretiminin genotoksisteye yol açabileceğini vurgulamışlardır. NO nitrosatif deaminasyon ile DNA hasarı ^{181,182}, NO₂ ile DNA zincir kırılması ¹⁸³, peroksinitrit ile oksidatif hasar ve DNA modifikasyonları yapabilir. ¹⁸⁴

Baş boyun yassı hücreli karsinomlarında NOS ekspresyonu ve aktivitesi çalışılmıştır.²³⁸⁻²⁴⁰ Gavilanes ve ark. faringolarengeal kanserli 26 hastanın örneklerinde NOS aktivitesini araştırmışlar ve tümör büyümesi ve malignansinin kalsiyumdan bağımsız NOS izoformunun enzimatik ürünü olan NO'daki değişikliklerle ilişkili olduğu öne sürülmüştür.²³⁸ Shigyo ve ark. yaptığı 63 yassı hücreli karsinomlu hastadan oluşan bir çalışmada normal larengeal epitelde iNOS için pozitif immünboyama saptanmazken, hafif/orta displaziden ağır displaziye ve karsinoma ilerlerken ekspresyon seviyeleri yükselmiş ve karsinomda en yüksek seviyelere ulaşmış.²⁴¹ Connolly ve ark.'nın düzenlediği 22 oral yassı hücreli karsinomu, 12 displazi ve 12 normal spesimenin immünhistokimyasal çalışmasında oral yassı hücreli karsinomlarında oral prekanseröz lezyonlarla kıyaslandığında NOS anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Bu çalışmada ayrıca normal epitle karşılaştırıldığında NO anlamlı olarak yüksek bulunmuş.²⁴² Chen ve ark. tarafından düzenlenen bir çalışmada bukkal karsinomlu 25 hastanın doku örnekleri immünhistokimya ve RT-PCR ile çalışılarak iNOS proteini (%64) ve mRNA (%53) aktivitesi tespit edilmiş.²⁴³ Gallo ve ark. 43 baş boyun yassı hücreli karsinomlu hastadan oluşan bir çalışmada baş boyun yassı hücreli karsinomlarında COX-2 ve NOS'un simultane up-regüle olduğunu ve her iki yolağın tümör anjiyojenezi ve lenf nodu metastazı ile güçlü korelasyonunu göstermişlerdir.²⁴⁴ Bu çalışmada iNOS geninin transkripsiyonunda 2 katlık artışın, tüm baş boyun yassı hücreli karsinom dokularında sağlıklı kontrol dokuları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Buna karşın, iNOS geninin ekspresyon miktarının kontrol dokularına kıyasla larenks yassı hücreli karsinom dokularında 3 kat arttığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin baş boyun yassı hücreli karsinomlarında ekspresyon düzeyi araştırılmıştır. Çalışmamızda kontrol komşu dokulardaki ekspresyon miktarı ile karşılaştırıldığında AA metabolizmasının önemli bileşenlerinden olan COX-2 ve ALOX12 geninin ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Çalışmada ekspresyonu değerlendirilen bir diğer gen olan iNOS'un ekspresyonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm baş boyun kanser dokularında artış saptanmış fakat istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte sadece larenks kanserleri değerlendirildiğinde üç gendeki ekspresyon miktarı kontrol dokularla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu bağlamda bu çalışma her üç genin ve dolayısıyla bunların ürünlerinin larenks kanserlerinde, COX-2 ve ALOX12 genlerinin de tüm baş boyun kanserlerinde rolü olduğunu literatür ile uyumlu bir şekilde göstermiştir. Bu çalışmanın mevcut literatür ile çelişen tek yönü tüm baş boyun kanser dokularında kontrol dokularla karşılaştırıldığında iNOS ekspresyonunda anlamlı derecede artış saptanmamasıdır. İnflamasyon ile karsinogenezi birbirine bağlayan pek çok çalışma mevcuttur. Özellikle bu çalışmanın konu olarak aldığı kanserde COX-2, ALOX12 ve iNOS gen ekspresyonlarının karsinogenezdeki rolü üzerinde literatürde sıkça durulmuştur. Dolayısıyla bu enzimlerin bazı seçilmiş kanserlerdeki eş zamanlı inhibisyonu bu kanserlerde güncel bir tedavi seçeneği olabilir.

6. ÖZET

Baş boyun yassı hücreli karsinomları dünya çapında önemli bir sağlık problemi, beşinci en yaygın kanser türü ve ölüm sebebidir. Baş boyun yassı hücreli karsinomlarının gelişiminde alkol, sigara, beslenme, meslek, viral enfeksiyon ve kötü ağız bakımı gibi belirli risk faktörleri olmasına rağmen, bu hastalığa yol açan mutasyonel olaylardan sorumlu net mekanizma henüz tanımlanamamıştır. Bununla birlikte sayılan risk faktörleri baş boyun kanserlerinin %5-10'unu açıklamamaktadır. Kronik inflamasyonun uzun zamandır pek çok bölgede kanserle ilişkisi, tümör oluşumunun önemli bir bileşeni olduğu bilinmektedir, fakat sorumlu mekanizma tam olarak tanımlanamamıştır.

Biyoaktif lipidlerin oluşumuna yol açan eikozanoid metabolizmasının kanser oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Siklooksijenaz (COX) ve lipooksijenaz (ALOX) yolaklarının metabolizmasının baş boyun kanserli hastaların tümör dokularında, plazmalarında ve tükürüklerinde arttığı bulunmuştur. Ayrıca, araşidonik asit metabolizmasıyla ilişkili çeşitli enzim ve genlerin farklı ekspresyonları yassı hücreli karsinogeneze katkıda bulunmaktadır. Son dönemlerde, COX enziminin tümör oluşumundaki rolü üzerinde durulmaktadır. Baş boyun kanserli hastalarda COX-2'nin aşırı eksprese edildiğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Artan COX-2 seviyeleri karsinogeneze ksenobiyotik metabolizma, apoptosis, immun yanıt ve anjiyenez üzerine olan etkileri yoluyla katkıda bulunur. Lipooksijenazın katalizlediği araşidonik asit metabolizmasının kanser oluşumundaki fonksiyonel rolü konusunda yeterli veri mevcuttur. Özellikle ALOX5 ve platelet tip ALOX12 izoenzimleri genel olarak prokarsinojenik kabul

edilirler. ALOX12 melanoma, prostat ve epidermal kanserler gibi farklı kanserlerde saptanmıştır. 12-HETE, ALOX12'nin tümör büyümesini ve hareketini düzenleyici roldeki tek metabolitidir. Fakat 12-HETE'nin baş boyun yassı hücreli karsinomlarındaki rolü tam olarak araştırılmamıştır.

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-arjinin'inden oluşur. NOS'un birbirine yapısal olarak çok benzeyen 3 izoformu bulunmaktadır; Nöronal NOS (nNOS), indüklenabilir NOS (iNOS), endotelyal NOS (eNOS). nNOS ve eNOS sırasıyla nöronlarda ve endotel hücrelerinde sürekli mevcuttur ve intraselüler Ca^{2+} yükselmesine ihtiyaç duyarlar. Bu izoformlar esas olarak kalsiyum girişi ile düzenlenir ve kısa zaman periyodunda düşük seviyede NO üretirler. Diğer yandan, iNOS her hücre tipinde sitokinler tarafından indüklenmesi şarttır ve uzun zaman periyodlarında yüksek konsantrasyonlarda NO üretebilirler. Meme, özofagus, barsak, prostat ve baş boyun kanserlerinin dahil olduğu pek çok malign tümörde iNOS'un eksprese edildiği bildirilmektedir. NOS hem tümör oluşumuna katkıda bulunup hem de inhibitör etkiye sahip olduğu için, NOS'un tümör biyolojisindeki rolü çok az anlaşılabilmiştir.

Bu çalışmada COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin baş boyun yassı hücreli karsinomlarında komşu normal dokuyla karşılaştırıldığında aşırı eksprese edilip edilmediği araştırılmıştır. Yirmi iki hastadan rezeksiyon sırasında kanser dokusu (5x5mm) ve komşu normal mukoza temin edildi. Yassı hücreli karsinom parçaları steril ependorf tüplere yerleştirildi ve hemen sıvı azotta donduruldu. Tüm dokular analiz zamanına kadar -80°C'de saklandı. COX-2, ALOX12 ve iNOS genlerinin ekspresyon seviyeleri real-time PCR ile saptandı. Tüm hastaların

tümör dokularında COX-2 gen ekspresyon miktarında gözlenen yaklaşık 11 katlık artışın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p = 0,001$). ALOX12 geninin ekspresyon miktarına bakıldığında tüm tümör dokuları için belirlenen yaklaşık 4 katlık artmanın da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p = 0,011$). Buna karşın iNOS geninin transkripsiyonundaki 2 katlık artışın, tüm tümör dokuları ile sağlıklı kontrol dokuları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p = 0.286$) Fakat larenks kanserli hastalarda iNOS geninin ekspresyon miktarının kontrol dokularına kıyasla 3 kat arttığı belirlenmiştir ($P = 0.041$). Bu veriler COX-2 ve ALOX12'nin tüm baş boyun kanserlerindeki potansiyel rolünü göstermektedir. Ayrıca üç enzimin de larenks kanserlerinde potansiyel rolü bulunmaktadır.

7. SUMMARY

Head and neck squamous cell carcinoma represent a major international health problem, accounting for the fifth most common type and cause of cancer-related death worldwide. Although certain risk factors for the development of head and neck squamous cell carcinoma including alcohol, tobacco, nutrition, occupation, viral infection and poor dentition are known, the exact molecular mechanisms responsible for mutational events leading to this disease have not been identified. These risk factors do not, however, adequately explain %5–10 of head and neck squamous cell carcinoma cases. Chronic inflammation has long been recognized as being associated with increased risk for human cancer at various sites and as an important component of tumorigenesis, although the mechanisms involved are not fully characterized.

Eicosanoid metabolism leads to generation of bioactive lipids known to promote cancer. Metabolism of both cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (ALOX) pathway have been found to be elevated in tumor tissues, plasma and saliva obtained from patients with head neck cancer. In addition, altered expression of various enzymes and genes related to arachidonic acid metabolism are known to contribute to squamous cell carcinogenesis. Recently, attention has been drawn to the role of the COX enzyme and its involvement in tumorigenesis. A large volume of data exists showing that COX-2 is over-expressed in head and neck squamous cell carcinomas. Increased levels of COX-2 may contribute to carcinogenesis by modulating xenobiotic metabolism, apoptosis, immun surveillance and angiogenesis. Substantial evidence supports a functional role for

lipooxygenase-catalyzed arachidonic acid metabolism in cancer development. ALOX5 and platelet type ALOX12 are generally considered procarcinogenic. ALOX12 has been found in different cancer tissues including melanoma, prostate and epidermal cancers. 12-HETE is the only metabolite of the arachidonic acid-metabolizing enzyme ALOX12 suggested to act as regulator of tumor growth and motility. However, the role of 12-HETE in squamous cell carcinoma of head neck has not been adequately investigated.

NO is synthesised from aminoacid L-arginine, by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). There are at least three NOS isoenzymes; endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) and inducible (iNOS). Since iNOS is independent of local calcium levels, it continues to produce NO for many hours or even days following induction. Several malignant neoplasms including breast, esophagus, intestine, prostate and as well as head and neck squamous cell carcinoma have been reported to express iNOS. The role of NOS in tumor biology is stil poorly understood, since NO appears to have both tumor promoting and inhibitory actions.

In this study we have investigated whether COX-2, ALOX12 and iNOS were overexpressed in squamous cell carcinoma of head neck compared with normal adjacent mucosa. Cancer tissues and adjacent normal mucosa for the control group were obtained from 22 patients who underwent resection of their tumors. Pieces (5x5 mm) of squamous cell carcinoma were placed in sterile tubes and frozen immediately in liquid nitrogen. All tissue samples were stored at -80°C until analysis. The real-time PCR was used to assess the expression of COX-2,

ALOX12 and iNOS genes. The results showed that COX-2 and ALOX12 mRNA expressions are significantly increased in squamous cell carcinoma of head and neck compared with adjacent normal mucosa. Expression of iNOS was not significantly elevated in tumor tissues compared with normal mucosa. However iNOS expression was found to be significantly elevated compared with normal adjacent mucosa in patients with laryngeal cancer. These data suggest that COX-2 and ALOX12 may play role in carcinogenesis of head and neck cancer. iNOS as well as COX-2 and ALOX12 may play a role in laryngeal carcinogenesis.

8. KAYNAKLAR

1. Williams and Warwick. Gray's Anatomy 36th British edition. W.B. Saunders Company Philadelphia Churchill Livingstone 1980.
2. Cummings CW, et al. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 4th ed. Mosby, Inc, Philadelphia 2005.
3. Bailey BJ, Biller JF. Surgical anatomy of the larynx. In Surgery of the larynx. Philadelphia 1985, WB Saunders, s 23.
4. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic Basis Of Disease 7th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2003.
5. Hunter T. Cooperation between oncogenes. Cell. 1991;64:249-70.
6. Hussey DH, Latourette HB, Panje WR. Head and neck cancer: an analysis of the incidence, patterns of treatment, and survival at the University of Iowa. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl. 1991;152:2-16.
7. Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Cancer. 1995;75:1343-53.
8. Spitz MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. Semin Oncol. 1994;21:281-8.
9. Blitzer PH. Epidemiology of head and neck cancer. Semin Oncol. 1988;15:2-9.
10. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005;55:74-108.
11. Singh B. Molecular pathogenesis of head and neck cancers. J Surg Oncol. 2008;97:634-9.

12. Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res.* 1998;18:4779-86.
13. Lehmann W, Raymond L, Faggiano F, Sancho-Garnier H, Blanchet F, Del Moral A, et al. Cancer of the endolarynx, epilarynx and hypopharynx in south-western Europe: assessment of tumoral origin and risk factors. *Adv Otorhinolaryngol.* 1991;46:145-56.
14. Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, et. al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1276-99.
15. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:43-66.
16. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24:9-17.
17. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2006.
18. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122:44-51.
19. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:268-74.
20. Cann CI, Fried MP, Rothman KJ. Epidemiology of squamous cell cancer of the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am.* 1985;18:367-88.

21. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;124:951-62.
22. Stewart BW, Kleihues P: World Cancer Report, WHO International Agency for Research on Cancer, IARC, Lyon, 2003.
23. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. Eur J Cancer. 2002;38:99-166.
24. Chen JK, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma. Epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. Cancer. 1990;66:1288-96.
25. Decker J, Goldstein JC. Risk factors in head and neck cancer. N Engl J Med. 1982;306:1151-5.
26. Licitra L, Rossini C, Bossi P, Locati LD. Advances in the changing patterns of aetiology of head and neck cancers. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2006;14:95-9.
27. Maran AG, Wilson JA, Gaze MN. The nature of the head and neck cancer. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1993;250:127-32.
28. Gluckman JL, Savoury WL. Carcinoma of the oral cavity. Otolaryngology, 3rd edition, 1991. WB Saunders Company. P:2041-67
29. Wynder EL, Stellman SD. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. Cancer Res. 1977;37:4608-22.
30. Rothman KJ, Cann CI, Flanders D, Fried MP. Epidemiology of laryngeal cancer. Epidemiol Rev. 1980;2:195-209.

31. Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jan 21;96(2):99-106.
32. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et.al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282-7.
33. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shagina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, et al. Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:696-703.
34. Herity B, Moriarty M, Bourke GJ, Daly L. A case-control study of head and neck cancer in the Republic of Ireland. *Br J Cancer.* 1981;43:177-82.
35. Wynder EL, Covey LS, Mabuchi K, Mushinski M. Environmental factors in cancer of the larynx: a second look. *Cancer.* 1976;38:1591-601.
36. Sturgis EM, Wei Q. Genetic susceptibility--molecular epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 2002;14:310-7.
37. Lieber CS, Seitz HK, Garro AJ, Worner TM. Alcohol-related diseases and carcinogenesis. *Cancer Res.* 1979;39:2863-86.
38. Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E, et al. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer.* 2002;87:516-8.
39. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005;32:S59-66.
40. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet.* 2004;363:1488-9.

41. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:467-75.
42. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 2004;108:766-72.
43. Fandi A, Altun M, Azli N, Armand JP, Cvitkovic E. Nasopharyngeal cancer: epidemiology, staging, and treatment. *Semin Oncol.* 1994;21:382-97.
44. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997 Sep;33:302-12.
45. Winn DM, Ziegler RG, Pickle LW, Gridley G, Blot WJ, Hoover RN. Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern United States. *Cancer Res.* 1984;44:1216-22.
46. Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Dal Maso L, et al. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study from Italy and Switzerland. *Int J Cancer.* 2002;100:355-60.
47. De Luca L, Maestri N, Bonanni F, Nelson D. Maintenance of epithelial cell differentiation: the mode of action of vitamin A. *Cancer.* 1972;30:1326-31.
48. Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2001 Feb;37(2):115-26.
49. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1600-8.

50. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 1995;63:769-73.
51. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;121:157-60.
52. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ*. 1996;313:716-21.
53. Spitz MR, Fueger JJ, Beddingfield NA, Annegers JF, Hsu TC, Newell GR, et al. Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Res*. 1989;49:4626-8.
54. Hsu TC, Johnston DA, Cherry LM, Ramkissoon D, Schantz SP, Jessup JM, et al. Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans: possible relationship to environmental carcinogenesis. *Int J Cancer*. 1989;43:403-9.
55. Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1991;1:83-9.
56. Schantz SP, Hsu TC. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head Neck*. 1989;11:337-42.
57. Spitz MR, Fueger JJ, Halabi S, Schantz SP, Sample D, Hsu TC. Mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993;2:329-33.

58. Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang ZF, Tobi H, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:530-5.
59. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA.* 1989;262:3313-5.
60. Wang LE, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. Mutagen sensitivity to benzo(a)pyrene diol epoxide and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 1998;4:1773-8.
61. Spitz MR, Fueger JJ, Borrad LG, Newell GR. The development of a comprehensive, institution-based patient risk evaluation program: I. Development, content, and data management. *Am J Prev Med.* 1988;4:183-7.
62. Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, et al. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis.* 1999;20:2125-9.
63. Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7:465-8.
64. Wei Q, Spitz MR, Gu J, Cheng L, Xu X, Strom SS, et al. DNA repair capacity correlates with mutagen sensitivity in lymphoblastoid cell lines. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5:199-204.
65. Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett.* 1999;146:93-101.

66. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer*. 1999;84:220-4.
67. Jourenkova-Mironova N, Voho A, Bouchardy C, Wikman H, Dayer P, Benhamou S, et al. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 1999;81:44-8.
68. Zheng TZ, Boyle P, Hu HF, Duan J, Jian PJ, Ma DQ, et al. Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control*. 1990;1:235-41.
69. Homann N, Tillonen J, Rintamäki H, Salaspuro M, Lindqvist C, Meurman JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol*. 2001;37:153-8.
70. Stucker FJ, Shockley WW. Skin cancer of head and neck. *Otolaryngology*, 3rd ed., volume III. 1991, WB Saunders Company. P:2599-2616
71. Ron E, Modan B, Preston D, Alfandary E, Stovall M, Boice JD Jr. Radiation-induced skin carcinomas of the head and neck. *Radiat Res*. 1991;125:318-25.
72. Budillon A. Molecular genetics of cancer. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer*. 1995;76:1869-73.
73. Weinberg RA. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;758:331-8.
74. Hatakeyama M, Herrera RA, Makela T, Dowdy SF, Jacks T, Weinberg RA. The cancer cell and the cell cycle clock. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:1-10.

75. Saranath D, Panchal RG, Nair R, Mehta AR, Sanghavi VD, Deo MG. Amplification and overexpression of epidermal growth factor receptor gene in human oropharyngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992;28B:139-43.
76. He Y, Zeng Q, Drenning SD, Melhem MF, Tweardy DJ, Huang L, et al. Inhibition of human squamous cell carcinoma growth in vivo by epidermal growth factor receptor antisense RNA transcribed from the U6 promoter. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Jul 15;90(14):1080-7. Erratum in: *J Natl Cancer Inst* 2002;94:633.
77. Nguyen DC, Parsa B, Close A, Magnusson B, Crowe DL, Sinha UK. Overexpression of cell cycle regulatory proteins correlates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 2003;22:1285-90.
78. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 1993;53:3579-84.
79. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N, et al. Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3:3-9.
80. Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I. Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:5325-9.
81. Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;121:790-4.

82. Akervall JA, Jin Y, Wennerberg JP, Zätterström UK, Kjellén E, Mertens F, et al. Chromosomal abnormalities involving 11q13 are associated with poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1995;76:853-9.
83. Rubin JS, Qiu L, Etkind P. Amplification of the Int-2 gene in head and neck squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*. 1995;109:72-6.
84. Somers KD, Cartwright SL, Schechter GL. Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene*. 1990;5:915-20.
85. Merritt WD, Weissler MC, Turk BF, Gilmer TM. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1990;116:1394-8.
86. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1994;74:152-8.
87. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*. 2002;112:472-81.
88. Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y, Sakaida N, Okamura A, Iwanaga M, et al. Cyclin-D1-gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein over-expression in human head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1997;74:576-81.
89. Saranath D, Panchal RG, Nair R, Mehta AR, Sanghavi V, Sumegi J, et al. Oncogene amplification in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Jpn J Cancer Res*. 1989;80:430-7.

90. Xu J, Gimenez-Conti IB, Cunningham JE, Collet AM, Luna MA, Lanfranchi HE, et al. Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer*. 1998;83:204-12.
91. Saranath D, Chang SE, Bhoite LT, Panchal RG, Kerr IB, Mehta AR, et al. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related human oral carcinoma in India. *Br J Cancer*. 1991;63:573-8.
92. Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:7716-9.
93. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-31.
94. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 1989;342:705-8.
95. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res*. 1993;53:4477-80.
96. Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klein-Szanto AJ. p53 alterations in human squamous cell carcinomas and carcinoma cell lines. *Am J Pathol*. 1993;142:1131-9.
97. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*. 2000;29:413-25.

98. Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:1118-22.
99. Van Oijen MG, van de Craats JG, Slootweg PJ. p53 overexpression in oral mucosa in relation to smoking. *J Pathol.* 1999;187:469-74.
100. Saranath D, Tandle AT, Teni TR, Dedhia PM, Borges AM, Parikh D, Sanghavi V, Mehta AR. p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. *Oral Oncol.* 1999;35:242-50.
101. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995;332:712-7.
102. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJ, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:519-29.
103. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995;332:429-35.
104. Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck.* 2002;24:841-9.
105. Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene.* 1997;14:1799-803.

106. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, Bot FJ, Dinjens WN, Ramaekers FC, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer*. 2003;107:394-400.
107. Sartor M, Steingrimsdottir H, Elamin F, Gäken J, Warnakulasuriya S, Partridge M, et al. Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer*. 1999;80:79-86.
108. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science*. 1987;238:193-7.
109. Martinez ME, Giovannucci E. Diet and the prevention of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1997;16:357-76.
110. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72:962-70.
111. Okada F. Inflammation and free radicals in tumor development and progression. *Redox Rep*. 2002;7:357-68.
112. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860-7.
113. Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW. Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. *J Immunol*. 2005;174:1647-56.
114. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*. 1998;104:2S-8S
115. Soberman RJ, Christmas P. The organization and consequences of eicosanoid signaling. *J Clin Invest*. 2003;111:1107-13.

116. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:145-82.
117. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* 1996;271:33157-60.
118. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998;12:1063-73.
119. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1299:125-40.
120. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5:241.
121. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med.* 2002;53:35-57.
122. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871-5.
123. Yoshimoto T, Yamamoto S. Arachidonate 12-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1995;12:195-212.
124. Kuhn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett.* 1999;449:7-11.
125. Fürstenberger G, Krieg P, Müller-Decker K, Habenicht AJ. What are cyclooxygenases and lipoxygenases doing in the driver's seat of carcinogenesis? *Int J Cancer.* 2006;119:2247-54.

126. Pidgeon GP, Lysaght J, Krishnamoorthy S, Reynolds JV, O'Byrne K, Nie D, Honn KV. Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26:503-24.
127. Kühn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res.* 2006;45:334-56.
128. Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Mol Cancer.* 2003;2:10.
129. Koshland DE Jr. The molecule of the year. *Science.* 1992;258:1861.
130. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 1994;120:227-37.
131. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* 1993;54:171-8.
132. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.
133. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004;75:639-53.
134. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.
135. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:255-66.
136. Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck.* 2002;24:792-9.

137. Perkins TM, Shklar G. Delay in hamster buccal pouch carcinogenesis by aspirin and indomethacin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;53:170-8.
138. Cornwall H, Odukoya O, Shklar G. Oral mucosal tumor inhibition by ibuprofen. *J Oral Maxillofac Surg.* 1983;41:795-800.
139. Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 1999;59:991-4.
140. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Vannacci A, Boddi V, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia.* 2001;3:53-61.
141. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2001;276:18563-9.
142. Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, Kitayama W, Endoh T, Sasaki Y, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide. *Cancer Res.* 2001;61:1451-6.
143. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K, Tsukuda M. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:1152-62.
144. Janot F, Massaad L, Ribrag V, de Waziers I, Beaune PH, Luboinski B, et al. Principal xenobiotic-metabolizing enzyme systems in human head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 1993;14:1279-83.

145. Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Tanabe T, Inoue H, Ramonetti JT, Dannenberg AJ. Benzo[a]pyrene up-regulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1997;18:795-9.
146. Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis*. 2001;22:5-10.
147. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*. 1995;83:493-501.
148. Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 1998;58:362-6.
149. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsujii M, Gunawan ES, Takei Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors suppress the growth of gastric cancer xenografts via induction of apoptosis in nude mice. *Am J Physiol*. 1998;274:G1061-7.
150. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*. 1990;76:655-63.
151. Balch CM, Dougherty PA, Cloud GA, Tilden AB. Prostaglandin E2-mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. *Surgery*. 1984;95:71-7.
152. Goodwin JS, Bankhurst AD, Messner RP. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. *J Exp Med*. 1977;146:1719-34.
153. Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol*. 1983;3:295-315.

154. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol.* 1995;154:3383-90.
155. Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol.* 2000;164:361-70.
156. Grinwich KD, Plescia OJ. Tumor-mediated immunosuppression: prevention by inhibitors of prostaglandin synthesis. *Prostaglandins.* 1977;14:1175-82.
157. Tilden AB, Balch CM. Indomethacin enhancement of immunocompetence in melanoma patients. *Surgery.* 1981;90:77-84
158. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998 May 29;93:705-16.
159. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest.* 2000;105:1589-94.
160. Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.* 2000;60:1306-11.
161. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:3336-40.

162. Dohadwala M, Luo J, Zhu L, Lin Y, Dougherty GJ, Sharma S, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. *J Biol Chem*. 2001;276:20809-12.
163. Tomozawa S, Nagawa H, Tsuno N, Hatano K, Osada T, Kitayama J, et al. Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522. *Br J Cancer*. 1999;81:1274-9
164. Cuendet M, Pezzuto JM. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. *Drug Metabol Drug Interact*. 2000;17:109-57.
165. Klurfeld DM, Bull AW. Fatty acids and colon cancer in experimental models. *Am J Clin Nutr*. 1997;66:1530S-1538S.
166. Yamamoto S, Suzuki H, Nakamura M, Ishimura K. Arachidonate 12-lipoxygenase isozymes. *Adv Exp Med Biol*. 1999;447:37-44.
167. Tang DG, Honn KV. Apoptosis of W256 carcinosarcoma cells of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: role of 12-lipoxygenase in regulating tumor cell survival. *J Cell Physiol*. 1997;172:155-70.
168. Shureiqi I, Wojno KJ, Poore JA, Reddy RG, Moussalli MJ, Spindler SA, et al. Decreased 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid levels and 15-lipoxygenase-1 expression in human colon cancers. *Carcinogenesis*. 1999;20(19):1985-95.
169. Subbarayan V, Xu XC, Kim J, Yang P, Hoque A, Sabichi AL, Llansa N, et al. Inverse relationship between 15-lipoxygenase-2 and PPAR-gamma gene expression in normal epithelia compared with tumor epithelia. *Neoplasia*. 2005;7:280-93.

170. Gonzalez AL, Roberts RL, Massion PP, Olson SJ, Shyr Y, Shappell SB. 15-Lipoxygenase-2 expression in benign and neoplastic lung: an immunohistochemical study and correlation with tumor grade and proliferation. *Hum Pathol.* 2004;35:840-9.
171. Shappell SB, Boeglin WE, Olson SJ, Kasper S, Brash AR. 15-lipoxygenase-2 (ALOX15-2) is expressed in benign prostatic epithelium and reduced in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 1999;155:235-45.
172. Tang DG, Bhatia B, Tang S, Schneider-Broussard R. 15-lipoxygenase 2 (ALOX152) is a functional tumor suppressor that regulates human prostate epithelial cell differentiation, senescence, and growth (size). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82:135-46.
173. Chen X, Wang S, Wu N, Sood S, Wang P, Jin Z, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6703-9.
174. Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;69:275-81.
175. Ohd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Löfberg H, Sjölander A. Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology.* 2003;124:57-70.
176. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer.* 2001;91:737-43.

177. Gao X, Grignon DJ, Chbihi T, Zacharek A, Chen YQ, Sakr W, et al. Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology*. 1995;46:227-37.
178. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:955-68.
179. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:175-95.
180. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO.) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288:F31-6.
181. Wink DA, Hanbauer I, Grisham MB, Laval F, Nims RW, Laval J, et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms. *Curr Top Cell Regul*. 1996;34:159-87.
182. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:3030-4.
183. Görsdorf S, Appel KE, Engholm C, Obe G. Nitrogen dioxide induces DNA single-strand breaks in cultured Chinese hamster cells. *Carcinogenesis*. 1990;11:37-41.
184. Yermilov V, Rubio J, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett*. 1995;376:207-10.
185. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*. 1988;1:249-57.

186. Wu Y, Brouet I, Calmels S, Bartsch H, Ohshima H. Increased endogenous N-nitrosamine and nitrate formation by induction of nitric oxide synthase in rats with acute hepatic injury caused by *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide administration. *Carcinogenesis*. 1993;14:7-10.
187. Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp*. 1995;61:33-45.
188. Laval F, Wink DA. Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis*. 1994;15:443-7.
189. Wink DA, Laval J. The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 1994;15:2125-9.
190. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*. 1994;305:253-64.
191. Calmels S, Hainaut P, Ohshima H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res*. 1997;57:3365-9.
192. Delaney CA, Green MH, Lowe JE, Green IC. Endogenous nitric oxide induced by interleukin-1 beta in rat islets of Langerhans and HIT-T15 cells causes significant DNA damage as measured by the 'comet' assay. *FEBS Lett*. 1993;333:291-5.
193. Tamir S, Burney S, Tannenbaum SR. DNA damage by nitric oxide. *Chem Res Toxicol*. 1996;9:821-7.
194. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 1991;254:1001-3.

195. Szabó C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide*. 1997;1:373-85.
196. Starke DW, Chen Y, Bapna CP, Lesnefsky EJ, Mieyal JJ. Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1997;23:373-84.
197. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993;11: 1026-30.
198. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The Real-time Polymerase Chain Reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27: 95-125.
199. Foy CA, Parkes HC. Emerging Homogeneous DNA-based Technologies in the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 990–1000.
200. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357:539-45.
201. Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:433-9.
202. Marnett LJ, Honn KV. Overview of articles on eicosanoids and cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 1994;13:237-9.
203. Bennett A, Carter RL, Stamford IF, Tanner NS. Prostaglandin-like material extracted from squamous carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*. 1980;41:204-8.
204. Jung TT, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope*. 1985;95:307-12.

205. Bennett A, Carroll MA, Stamford IF, Whimster WF, Williams F. Prostaglandins and human lung carcinomas. *Br J Cancer*. 1982;46:888-93.
206. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med*. 1993;122:518-23.
207. Metzger K, Angres G, Maier H, Lehmann WD. Lipoxygenase products in human saliva: patients with oral cancer compared to controls. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:185-94.
208. Klapan I, Katić V, Culo F, Cuk V. Prognostic significance of plasma prostaglandin E concentration in patients with head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1992;118:308-13.
209. El Attar TM, Lin HS, Vanderhoek JY. Biosynthesis of prostaglandins and hydroxy fatty acids in primary squamous carcinomas of head and neck in humans. *Cancer Lett*. 1985 Jul;27:255-9.
210. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998;93:705-16.
211. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*. 1998;58:1208-16.
212. Mestre JR, Chan G, Zhang F, Yang EK, Sacks PG, Boyle JO, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;889:62-71.

213. Dong P, Li X, Yu Z, Lu G. Expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 in patients with primary laryngeal carcinoma: a tissue microarray study. *J Laryngol Otol.* 2007;121:1177-83.
214. Tang DW, Lin SC, Chang KW, Chi CW, Chang CS, Liu TY. Elevated expression of cyclooxygenase (COX)-2 in oral squamous cell carcinoma--evidence for COX-2 induction by areca quid ingredients in oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:522-9.
215. Pandey M, Prakash O, Santhi WS, Soumithran CS, Pillai RM. Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37:379-83.
216. Funk CD. Molecular biology in the eicosanoid field. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1993;45:67-98.
217. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Res.* 1988;195:137-49.
218. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res.* 1991;250:3-16.
219. Tang DG, Grossi IM, Chen YQ, Diglio CA, Honn KV. 12(S)-HETE promotes tumor-cell adhesion by increasing surface expression of alpha V beta 3 integrins on endothelial cells. *Int J Cancer.* 1993;54:102-11.
220. Honn KV, Tang DG, Crissman JD. Platelets and cancer metastasis: a causal relationship? *Cancer Metastasis Rev.* 1992;11:325-51.
221. Nie D, Honn KV. Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:799-807.

222. Natarajan R, Esworthy R, Bai W, Gu JL, Wilczynski S, Nadler J. Increased 12-lipoxygenase expression in breast cancer tissues and cells. Regulation by epidermal growth factor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:1790-8.
223. Kamitani H, Geller M, Eling T. The possible involvement of 15-lipoxygenase/leukocyte type 12-lipoxygenase in colorectal carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1999;469:593-8.
224. Nie D, Hillman GG, Geddes T, Tang K, Pierson C, Grignon DJ, et al. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 1998;58:4047-51.
225. Honn KV, Tang DG, Gao X, Butovich IA, Liu B, Timar J, et al. 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1994;13:365-96.
226. Chen YQ, Duniec ZM, Liu B, Hagmann W, Gao X, Shimoji K, et al. Endogenous 12(S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis. *Cancer Res.* 1994;54:1574-9.
227. El Attar TM, Lin HS, Vanderhoek JY. Biosynthesis of prostaglandins and hydroxy fatty acids in primary squamous carcinomas of head and neck in humans. *Cancer Lett.* 1985;27:255-9.
228. Shureiqi I, Xu X, Chen D, Lotan R, Morris JS, Fischer SM, Lippman SM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in esophageal cancer cells by restoring 15-lipoxygenase-1 expression. *Cancer Res.* 2001;61:4879-84.
229. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2006;17:55-7.

230. McMullin BB, Chittock DR, Roscoe DL, Garcha H, Wang L, Miller CC. The antimicrobial effect of nitric oxide on the bacteria that cause nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients in the intensive care unit. *Respir Care*. 2005;50:1451-6.
231. Cifone MG, Cironi L, Meccia MA, et al. Role of nitric oxide in cell-mediated tumor cytotoxicity. *Adv Neuroimmunol* 1995;5:443-61.
232. Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Wang Y, Fidler IJ. Destruction of bystander cells by tumor cells transfected with inducible nitric oxide (NO) synthase gene. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:421-7.
233. Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck*. 2001;23:217-22.
234. Vamvakas S, Schmidt HH. Just say NO to cancer? *J Natl Cancer Inst*. 1997;89:406-7.
235. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev*. 1998;17:107-18.
236. Fukumura D, Jain RK. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 1998;17:77-89.
237. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4392-6.
238. Gavilanes J, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Pérez A, Leza JC, et al. Nitric oxide synthase activity in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*. 1999;109:148-52.

239. Gallo O, Masini E, Morbidelli L, Franchi A, Fini-Storchi I, Vergari WA, et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:587-96.
240. Rosbe KW, Mims JW, Prazma J, Petrusz P, Rose A, Drake AF. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase activity in upper respiratory epithelium. *Laryngoscope.* 1996;106:1075-9.
241. Shigyo H, Nonaka S, Katada A, Bandoh N, Ogino T, Katayama A, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in various laryngeal lesions in relation to carcinogenesis, angiogenesis, and patients' prognosis. *Acta Otolaryngol.* 2007;127:970-9.
242. Increased nitric oxide levels and iNOS over-expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41:261-7.
243. Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Increased expression of inducible nitric oxide synthase for human buccal squamous-cell carcinomas: immunohistochemical, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR studies. *Head Neck.* 2002;24:925-32.
244. Gallo O, Fabbioni V, Sardi I, Magnelli L, Boddi V, Franchi A. Correlation between nitric oxide and cyclooxygenase-2 pathways in head and neck squamous cell carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299:517-24.