

**UMUTCAN DEMIRAL**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**

**İSTANBUL-2021**



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

( DOKTORA TEZİ )

ORAL KANSER HÜCRE SOYUNDA 5- FLUOROURASİL  
VE SİSPLATİN KEMOTERAPÖTİK AJANLARININ  
DOKSİSİKLİN ANTİBİYOTİĞİ İLE ETKİLEŞİMİNİN  
ARAŞTIRILMASI

UMUTCAN DEMİRAL

DANIŞMAN  
DOÇ. DR. KIVANÇ BEKTAŞ KAYHAN

AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI  
AĞIZ, DIŞ, ÇENE HASTALIKLARI PROGRAMI

İSTANBUL- 2021

**TEZ ONAYI**



**BEYAN**



# İTHAF



## TEŞEKKÜR



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Oral Kavite.....	3
2.2. Oral Kavite Kanserlerinde Sınıflama.....	3
2.3. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) .....	5
2.3.1. Epidemiyoloji.....	5
2.3.2. Risk Faktörleri.....	7
2.3.2.1. Tütün ve Alkol .....	7
2.3.2.2. Betel (Areca) Nut .....	7
2.3.2.3. Human Papilloma Virus (HPV) .....	7
2.3.2.4. Beslenme .....	8
2.3.2.5. Lokal Travma ve Oral Hijyen .....	8
2.3.2.6. Oral Potansiyel Malign Lezyonlar .....	9
2.3.2.6.1. Lökoplaki.....	9
2.3.2.6.2. Eritroplaki.....	10
2.3.2.6.3. Oral Liken Planus.....	10
2.3.2.6.4. Oral Submukozal Fibrozis.....	11
2.3.2.6.5. Oral Mukozanın Diğer Potansiyel Malign Lezyonları.....	12
2.3.2.7. Diğer Risk Faktörleri.....	12
2.4. Oral Kavite Kanserlerinde Evreleme .....	13

2.5. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomlarda Tedavi Yöntemleri .....	15
2.5.1. Cerrahi Tedavi.....	16
2.5.2. Radyoterapi .....	17
2.5.2.1. Brakiterapi.....	18
2.5.3. Kemoterapi.....	18
2.5.3.1. Sisplatin.....	19
2.5.3.2. 5- Fluorourasil (5- FU).....	20
2.5.3.3. Hedefe Yönelik Kemoterapi .....	21
2.5.3.3.1. Epitelyal Büyüme Faktör Reseptörünü (EBFR) Hedefleyen İlaçlar.....	21
2.5.3.3.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünü (VEBF) Hedefleyen İlaçlar .....	22
2.5.3.4. Kemoterapide Kombine Protokoller .....	22
2.5.4. Fotodinamik Terapi.....	23
2.5.5. Gen tedavileri .....	24
2.5.6. İmmünoterapi .....	24
2.5.7. İlaçların Yeniden Konumlandırılması.....	25
2.5.7.1. Baş-Boyun Kanserlerinde Antibiyotiklerin Yeniden Konumlandırılması .....	26
2.5.7.1.1. Doksisisiklin.....	27
2.6. Hücre Kültürü .....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Gereçler.....	30
3.1.1. Kimyasal Malzemeler ve Kitler .....	30
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	30
3.2. Yöntemler .....	31
3.2.1. Hücre Hatlarının Yetiştirilmesi ve Kültür İşlemleri .....	31
3.2.2. Uygulanacak İlaç Dozlarının Hazırlanması .....	32
3.2.3. Hücre Sayımı ve İlaç Dozlarının Uygulanması .....	32
3.2.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi.....	33
3.2.5. Annexin V-FITC Yöntemi ile Apoptoz-Nekroz Tayini.....	33
3.2.6. Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Analizi.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. WST-1 Bulguları.....	35
4.1.1. İlaç Uygulamalarının OSC-19 Hücre Hattı Üzerinde Canlılığa Etkisi .....	35

4.1.2. İlaç Uygulamalarının MRC-5 Hücre Hattı Üzerindeki Canlılığa Etkisi.....	37
4.2. Flow Sitometri Yöntemi ile Apoptoz/Nekroz Tayini .....	40
5. TARTIŞMA .....	42
KAYNAKLAR .....	49
HAM VERİLER .....	62
FORMLAR .....	63
ETİK KURUL KARARI .....	64
PATENT HAKKI İZİNİ .....	65
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	67



**TABLÖLAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: DSÖ Oral Kavite Malignitelerinin Sınıflandırılması, 2017.....	4
Tablo 2-2: Uluslararası Kanseri Birliği ve Amerikan Kanseri Birliği Komitesi'nin TNM evreleme sistemi, 2018.....	14
Tablo 2-3: İleri evre oral kanserlerde mevcut kemoterapi uygulama protokolü.....	23
Tablo 3.1. Uygulanacak olan ilaç kombinasyonları.....	34



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 OSC-19 hücre hattı 24 saatlik inkübasyon sonuçları.....	36
Şekil 4.2 OSC-19 hücre hattı 48 saatlik inkübasyon sonuçları.....	37
Şekil 4.3 OSC-19 hücre hattı 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	37
Şekil 4.4 MRC-5 hücre hattı 24 saatlik inkübasyon sonuçları.....	38
Şekil 4.5 MRC-5 hücre hattı 48 saatlik inkübasyon sonuçları.....	38
Şekil 4.6 MRC-5 hücre hattı 72 saatlik inkübasyon sonuçları.....	39
Şekil 4.7 OSC-19 ve MRC-5 hücre hatlarının artan dozlarda Doksisisiklin+ Sisplatin ve Doksisisiklin+ 5-Fluorourasil ilaç kombinasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda hücre canlılığındaki azalma miktarları.....	40
Şekil 4.8 OSC-19 hücre hattında bireysel ve kombine halde uygulanan ilaçların apoptoz analiz sonuçları.....	41

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
- OSC-19: Skuamöz karakterli dil kanseri hücre hattı
- MRC 5: Sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı
- OSHK: Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
- HPV: Human Papillom Virüs
- PVL: Proliferatif Verrüköz Lökoplaki
- OLP: Oral Liken Planus
- OSF: Oral Submukoz Fibrozis
- GVHD: Graft versus Host Disease
- TNM: Tümör, lenf düğümü, metastaz
- AJCC: Amerikan Birleşik Kanser Komitesi
- YART: Yoğunluk ayarlı radyoterapi
- EBFR: Epitelyal büyüme faktör reseptörü
- VEBF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
- PD-1: Programlanmış hücre ölümü reseptörü 1
- PD-L1: Programlanmış hücre ölümü ligandı 1
- MMP: Matriks metalloproteinaz
- DMSO: Dimetil sülfoksit
- FITC: Floresan İzotiyosiyanat
- PI: Propidyum İyodür
- FDA: Food and Drug Administrations

## ÖZET

Demiral, U. Oral Kanser Hücre Soyunda 5- Fluorurasil ve Sisplatin Kemoterapötik Ajanlarının Doksisiklin Antibiyotiği ile Etkileşiminin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2021.

Oral kanserler, oral kavite ve dudakları kapsayan anatomik alanda görülen lokal destrüksiyon ve metastaz yapma kapasitesinde olan malign neoplazmlardır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre oral kanser insidansı 4/100.000 olarak tahmin edilmektedir. Hastaların yaşam kalitesi üzerindeki etkileri, tedavi başarı oranlarının düşüklüğü ve tedavilerin ciddi yan etkilere sahip olması, oral kanserlerin her zaman önemli bir araştırma konusu olmasına neden olmuştur. Geleneksel tedavilerin meydana getirdiği yan etkileri azaltmak için son yıllarda birçok farklı tedavi denemeye başlanmış, özellikle son yıllarda bitkisel kaynaklı preparatların yanı sıra antibiyotiklerin de antineoplastik özellikleri daha çok araştırılmaya başlanmıştır. Doksisiklin genellikle üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni, bronşit, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, periodontal hastalıklar ve stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Bu çalışmada doksisiklin, olası antineoplastik özelliğinin araştırılması amacıyla 5- Fluorurasil (5-FU) ve sisplatin kemoterapötik ajanları ile birlikte skuamöz hücreli oral kanser hattına (OSC-19) farklı doz ve farklı zamanlarda bireysel ve kombine olarak ayrı ayrı uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak sağlıklı akciğer fibroblast hücre hattı (MRC5) kullanılmıştır. Çalışmada sitotoksikite testi için WST-1, apoptoz/nekroz tayini için Annexin V yöntemi kullanılmıştır. En öne çıkan bulgumuz 25 µM konsantrasyonda uygulanan doksisiklinin, 25 µM sisplatin ile kombinasyonunun erken dönem apoptozu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artırdığı, 25 µM 5-FU ile kombinasyonunun ise erken dönem apoptozu istatistiksel olarak anlamlı biçimde artırdığını göstermiştir ( $p<0.05$ ). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, doksisiklin ve kemoterapötik ajan kombinasyonlarının ek parametrelerle daha ileri çalışmalara öncülük etme potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: oral kanser, doksisiklin, 5- fluorurasil, sisplatin, ilaç yeniden konumlandırma

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34437

## ABSTRACT

Demiral U. Investigation of the Interaction of 5-Fluoruracil and Cisplatin Chemotherapeutic Agents with Doxycycline Antibiotic in Oral Cancer Cell Line. İstanbul University, Graduate School of Health Science, Department of Oral and Maxillofacial Surgery. PhD Thesis. İstanbul. 2021.

Oral cancers are malignant neoplasms with local destruction and metastasis capacity seen in the anatomical area including the oral cavity and lips. According to the World Health Organization (WHO) data, the incidence of oral cancer is estimated to be 4 cases per 100,000 people. Oral cancers have always been an important research topic due to their effects on the quality of life of patients, low treatment success rates and serious side effects of treatments. In order to reduce the side effects of traditional treatments, many different methodologies have been tried in recent years, and especially in recent years, the anticancer properties of antibiotics as well as herbal and animal-derived preparations have been started to be investigated. Doxycycline is an antibiotic generally used in the treatment of upper respiratory tract infections, pneumonia, bronchitis, sexually transmitted diseases, gastrointestinal diseases, periodontal diseases and staphylococcal infections. In this study, in order to investigate its possible anticancer properties, doxycycline, together with 5-Fluoruracil (5-FU) and cisplatin chemotherapeutic agents, was applied to the squamous tongue cancer cell line (OSC-19) individually and in combination at different doses and at different times. A healthy lung fibroblast cell line (MRC5) was used as a control group. WST-1 method was used for cytotoxicity test and Annexin V method was used for apoptosis/necrosis determination in the study. The results showed that the combination of doxycycline administered at 25  $\mu$ M concentration with 25  $\mu$ M cisplatin increased early apoptosis although not significantly, while its combination with 25  $\mu$ M 5-FU significantly increased early apoptosis ( $p < 0.05$ ). According to the results of this study, it was observed that the combination of doxycycline and chemotherapeutic agent has the potential to lead to further studies with additional parameters.

**Key Words:** oral cancer, doxycycline, 5-fluoruracil, cisplatin, drug repositioning

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 34437

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız sağlığı, genel sağlık, refah ve yaşam kalitesinin önemli göstergelerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ağız sağlığını, çiğneme, konuşma, gülümseme fonksiyonlarını eksiksiz biçimde yerine getirme, kronik ağız ve yüz ağrısından, oral ve farenks kanserlerinden, oral bölge enfeksiyonu ve yaralarından, periodontal hastalıklardan, diş çürüğünden ve diş kaybından uzak olma durumu olarak tanımlar (DSÖ, 2020).

Oral kanserler, oral kavite ve dudakları kapsayan anatomik alanda görülen lokal destrüksiyon ve metastaz yapma kapasitesinde olan malign neoplazmlardır. DSÖ verilerine göre oral kanser insidansı tüm dünyada 4/100.000 olarak tahmin edilmektedir. Bunun yanı sıra dünya çapında tüm yaş gruplarında 5 yıllık prevalansın 12,3/100.000 olduğu raporlanmıştır (GLOBOCAN 2020). Oral kanserler erkeklerde ve yaşlılarda daha sık görülür; sosyoekonomik durum da oldukça önemli bir etkidir (Ferlay ve ark., 2018).

Sağkalımın oldukça düşük olması, hastaların yaşam kalitesi üzerindeki negatif etkileri, hastaları psikolojik olarak etkileyen özgüven sorunları yaratması, tedavi başarı oranlarının düşüklüğü ve tedavilerinin ciddi yan etkilere sahip olması oral kanserlerin her zaman araştırma konusu olmasına neden olmuştur.

Lezyonlar erken evrede tespit edilirse yalnızca cerrahi ya da radyoterapi ile tedavi yeterli olabilmektedir. Ancak lezyon ileri evrede ise, primer lezyonun lokasyonu ve büyüklüğü ideal bir cerrahiye imkan vermezse kombine tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Radyoterapi ve kemoterapi ile kombine tedavilerde başarı oranları yükselmesine rağmen yan etkiler de artmaktadır (Hartner, 2018).

Sitotoksik kemoterapinin doza bağlı yan etkileri nefrotoksisite, miyelosupresyon, nörotoksisite, anafilaksi, lökopeni, nötropeni, trombositopeni, anemi, hepatotoksisite, ototoksisite, kardiyotoksisite, bulantı ve kusma, diyare, mukozit, stomatit, ağrı, alopesi, anoreksi, kaşeksi ve asteni olarak sıralanabilir (Oun ve ark., 2018). Geleneksel tedavilerin meydana getirdiği yan etkileri azaltmak için son yıllarda birçok farklı tedavi denenmeye başlanmış, bu çalışmalarda antibiyotikler de yer almıştır. Mevcut kemoterapötik ajanların yan etkilerinin fazla olması, antibiyotikler gibi

sağlıklı hücrelerde toksik etki yaratmayan ve etkinliği daha önce kanıtlanmış ajanların kullanımına ve araştırılmasına olan ilgiyi artırmıştır (Peiris-Pages ve ark, 2015).

Oral kanserlerin tedavisi için farklı antibiyotikler ve kemoterapötik ajanların birbirleriyle olan kombinasyonları ile ilgili ön çalışmalar henüz sınırlı sayıda olsa da umut vadetmektedir. Bu çalışmada doksisiklin, olası antineoplastik etkinliğinin araştırılması amacıyla skuamöz hücreli oral kanser hattına hem bireysel olarak hem de sisplatin ve 5- Fluorurasil kemoterapötik ajanlarıyla ayrı ayrı kombine edilerek uygulanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Oral Kavite

Oral kavite, dudaklar, dil, bukkal mukoza, maksilla, mandibula, dişler, diş etleri, ağız tabanı, yumuşak ve sert damağı içeren kompleks bir yapıdır. Oral kavite çiğneme, yutma, konuşma gibi hayati fonksiyonlarının yanı sıra ikincil solunum yolu ve ayrıca kemosensör bir organ olarak da işlev görmektedir (Omura, 2014). Oral kavitedeki küçük bir yaralanma ya da hastalık bile bireyin beslenme yetersizliğı yaşamasına ve iletişiminde aksaklık meydana gelmesine neden olabilir (Norton 2017).

### 2.2. Oral Kavite Kanserlerinde Sınıflama

Oral kanserlerin sınıflandırılması bilimsel gelişmelere paralel olarak belirli aralıklarla güncellenmektedir. DSÖ'nün tümörlerin histopatolojisini ve kanserlerin biyolojik davranışını tanımlamak için oluşturduğu, en son 2017'de güncellenen oral kavite malignitelerinin sınıflaması Tablo 2-1'de gösterilmiştir(Seethala, 2017).

**Tablo 2-1: DSÖ Oral Kavite Malignitelerinin Sınıflandırılması, 2017**

<b><i>Epitelyal tümörler ve lezyonlar</i></b>	<b>Skvamöz hücreli karsinom</b>
	Düşük dereceli oral epitelyal displazi
	Yüksek dereceli oral epitelyal displazi
	Proliferatif verrüköz lökoplaki
<b><i>Papillomlar</i></b>	Skvamöz hücreli karsinom
	Kondiloma akuminatum
	Verruka vulgaris
	Multifokal epitelyal hiperplazi
<b><i>Oral mukozal melanom</i></b>	
<b><i>Hematolenfoid tümörler</i></b>	CD30+ T hücreli lenfoproliferatif hastalıklar
	Plazmablastik lenfoma
	Langerhans hücreli histiyositoz
	Ektramedüller Myeloid Sarkom
<b><i>Histogenezi kesin olmayan tümörler</i></b>	Konjenital granüler hücreli epulis
	Ektomezenkimal kondromiksoid tümör
<b><i>Yumuşak doku ve nöral doku kaynaklı tümörler</i></b>	Granüler hücreli tümör
	Rabdomiyom
	Lenfanjiyom
	Hemanjiyom
	Schwannom
	Nörofibrom
	Kaposi Sarkomu
	Miyofibroblastik sarkom
<b><i>Tükürük bezi tümörleri</i></b>	Mukoepidermoid karsinom
	Pleomorfik adenom

### 2.3. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK)

Solid tümörler, doku içindeki bir hücre grubundan kaynaklanan, dokunun yapısını ve organizasyonunu bozan anormal kitlelerdir. Köken aldığı dokuya göre solid tümörler sarkomlar ve karsinomlar olarak sınıflandırılır. Sarkomlar, kemikte veya yumuşak dokudaki mezenkimal hücrelerin (kıkırdak, kaslar, vasküler doku veya bağ dokusu gibi) diferansiyasyonundan kaynaklanır. Karsinomlar ise cilt, akciğerler, sindirim sistemi ve ağız boşluğu gibi çeşitli organların duvarını örten epitel hücrelerinden kaynaklanır. En sık görülen karsinom türleri bazal hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomdur. Bazal hücreli karsinom cildin en sık görülen kanseri iken, skuamöz hücreli karsinom baş- boyun bölgesinde en sık görülen kanserdir ve olguların yaklaşık %90'ını oluşturur (Porcheri ve ark, 2017).

#### 2.3.1. Epidemiyoloji

Güncel kanser verilerine göre, dünyada dudak ve oral kavite kanseri olgularının sayısı yıllık 377.713 olarak tahmin edilmektedir ve yaşa göre standartize edilmiş insidans oranı, erkekler için 6/100.000, kadınlar için 2,3/100.000 olarak öngörülmektedir. Beklenen yıllık mortalite insidansı erkeklerde 2,8/100.000, kadınlarda 1/100.000 olarak raporlanmıştır. Dudak ve oral kavite kanserleri, düşük / orta gelirli ülkelerde 10,2/100.000 oranıyla erkeklerde görülen en yaygın sekizinci malignite olarak bildirilmiştir (Sung ve ark, 2021).

En yüksek oral kanser oranları Güney ve Güneydoğu Asya'da ve Pasifik Adaları'nda görülmüştür. Papua Yeni Gine, her iki cinsiyette de dünya çapında en yüksek insidansa sahiptir (Sung ve ark, 2021). Hindistan ve Sri Lanka'da, erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri oral kanserlerdir (Pollaers ve ark., 2017; Cheong ve ark., 2017). Oral kanserlerin sık görüldüğü diğer ülkeler arasında Fransa, Macaristan, Brezilya, Küba ve Porto Riko bulunmakta, ayrıca görülme sıklığı birçok Doğu Avrupa ülkesinde de artmaktadır. Oral kanserler için beş yıllık sağkalım oranları ABD ve Avrupa'daki birkaç büyük kanser tedavi merkezinden bildirilen artışlar dışında diğer merkezlerde son iki- üç dekatta sabit kalmıştır (Hussein ve ark, 2017).

Türkiye'de kanser, 1982 yılında bildirilmesi zorunlu hastalıklar arasına alınmış, bir yıl sonra da Kanserle Savaş Daire Başkanlığı kurulmuştur. Daha önceleri pasif sistemle yapılan kanser kayıt sisteminde yeterli sayıda ve kalitede verinin toplanamaması nedeniyle 1992 yılında aktif sistem ile kayıt tutulmaya başlanmıştır.

2013 yılı itibariyle 81 ilde aktif kanser kayıt sistemi kurulmuştur, 2012 yılına kadar örnekleme olan nüfus oranı %23,4 iken 2016 yılı raporu kapsamında örnekleme nüfus oranı %50,2'ye ulaşmıştır. Aktif kanser kayıt merkezlerinin bulunduğu şehirlerde nüfus tabanlı kanser kaydı yapılmaktadır ve bu kayıtlar tüm kamu, üniversite ve özel hastanelerden, ölüm belgelerinden, hastaların bulunabileceği huzurevi gibi merkezlerden toplanmaktadır (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2016).

2016 yılında ülkemizde yayınlanan son kanser istatistiklerine göre dudak, dil, oral kavite, tükürük bezi ve tonsilleri içeren oral kanserlerin görülme oranları erkeklerde 3,2/100.000, kadınlarda ise 1,9/100.000 olarak hesaplanmıştır. Son 5 yılda toplam 5224 oral kanser olgusu tespit edilmiştir ve oral kanserlerin tüm kanserlere oranı 11/1000'dir (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2016).

OSHK erkeklerde daha fazla görülür ve genellikle 5. dekattan sonra ortaya çıkar. Olguların en sık görüldüğü Asya ülkelerinde ortalama tanı yaşı 5. ve 6. dekatta iken, Kuzey Amerika ülkelerinde 7. ve 8. dekattadır. Bununla birlikte oral kanserlerin %4-6'sının artık 40 yaşından küçük yaşlarda ortaya çıktığı ve dünyanın birçok yerinde 20-23 yaş arası genç popülasyonda oral kanser insidansında endişe verici bir artış olduğu bildirilmiştir. Bilinen risk faktörlerinin yokluğunda, hem genç hem de yaşlı hastalarda skuamöz hücreli karsinom olgularının ortaya çıktığı ve hastalığın özellikle yaşlılarda agresif bir seyir izleyebileceği de rapor edilmiştir (Johnson ve Amarasinghe, 2019).

OSHK gelişimi için en yüksek riskli bölgeler ağız tabanı ve dil (özellikle dilin lateral sınırı) olarak bildirilmiştir. Bunun nedeni, suda çözünebilir karsinojenlerin ağız tabanı içinde çözünerek birikmesi ve bu havuzda lokalize olan dilin bu maddelerle uzun süreli teması olarak açıklanmaktadır. Ayrıca bu bölgelerin daha ince ve keratinize olmayan epiteli nedeniyle doku penetrasyonu daha yüksektir. Alkol kullanan bireylerde dehidratasyon ve membranların seçici geçirgen özelliklerinin azalmasından dolayı, karsinojenlerin doku içine geçişi kolaylaşır; böylelikle alkol ile sigara, kanser gelişiminde sinerjist etki göstermiş olur. Diş etleri, dil sırtı, damak ve tükürük bezlerinde oral kanser görülme sıklığı daha düşüktür (Johnson ve ark., 2019).

### **2.3.2. Risk Faktörleri**

#### **2.3.2.1. Tütün ve Alkol**

Tütün, tütün mamülleri ve alkolün farklı kanser türleri üzerine etkileri uzun yıllardır bilinmektedir. Tütün formlarından en sık tüketilen sigaranın 1930'lu yıllarda kanserle ilişkisi öngörülmüş, epidemiyolojik çalışmalar sonunda Doll ve Hill sigaranın akciğer kanseriyle kesin ilişkisini duyurmuşlardır (Doll ve Hill, 1954). Sigara, nitrozaminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, nitroz dietanol, nitrozoprolin ve polonyum gibi altmıştan fazla karsinojen madde içermektedir (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2007). Primer kanser geliştirme riskine ek olarak, tekrarlayan oral kanser riski, kanser tedavisinden sonra sigara içimine devam edilmesiyle ilişkili bulunmuştur. Bir yıl boyunca gözlenen bireylerin %18'inde kanser nüks etmiş veya ikincil olarak oral kanser gelişmiştir. Sigara içmenin kanser riski üzerindeki etkisi, bıraktıktan sonraki 5 ile 10 yıl arasındaki süreçte azalmaya başlamaktadır (Warnakulasuriya, 2009; Mehrtash ve ark., 2013).

#### **2.3.2.2. Betel (Areca) Nut**

Seylan kaşusunun (*Areca catechu*) meyvesinin tohumu olan betel nut, özellikle Hindistan, Tayvan ve Çin'in bazı bölgelerinde yaygın olarak kullanılan keyif verici bir maddedir. Doğal ya da işlenmiş ince betel nut dilimleri, kireç kaymağında kakule, hindistan cevizi ve safran gibi besinlerle karıştırılıp tüketilmektedir. Tütün ürünleri ile karıştırıldığında veya betel biberinin yaprağına sarıldığında daha da zararlı hale gelir. Tütün eklense de eklenmese de betel nut çiğneme alışkanlığı olan kişilerde oral kanser gelişme riski oldukça yüksektir ve lezyonlar sıklıkla bukkal mukozada görülür (Liu ve ark., 2017).

Betel nut'un yaş grubu ve sosyoekonomik durum ayırt edilmeksizin, dünya çapında 200-400 milyon kişi tarafından kullanıldığı tahmin edilmektedir. Yüzyıllardır kullanılan bu madde, birçok sosyokültürel aktivite ve dini aktiviteye de derinlemesine yerleşmiştir (Singh ve ark., 2020).

#### **2.3.2.3. Human Papilloma Virus (HPV)**

HPV'ler deri ve mukozal yüzeylerdeki bazal epitelyal tabaka hücrelerini enfekte eden DNA virüsleridir ve 120'den fazla HPV alt türü vardır. HPV-16 ve HPV-18, malign tümörlerle olan ilişkileri nedeniyle yüksek riskli alt tipler olarak kabul edilir.

Tek başına HPV-16, HPV pozitif orofarengal kanserlerin yaklaşık %85- 95'i ile ilişkilidir. Virüs konakçı hücreye nüfuz eder ve çoğalabileceği konakçı hücrenin genomuna entegre olur. Malign dönüşüm, E6 ve E7 viral onkojenlerinin ekspresyonu yoluyla gerçekleşir. HPV, esas olarak vajinal, anal ve oral seks yoluyla doğrudan temas ile bulaşır. HPV pozitif bir bireyde orofarengal kanser gelişme riski, yaşam boyu cinsel partnerlerin sayısının artması, ilk cinsel aktivitedeki genç yaş ve aynı cinsiyetten partnere sahip olma öyküsü ile artmaktadır (Walline ve ark., 2013; Mirghani ve ark., 2014).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1984-2004 yılları arasında yapılan biyopsi ve operasyonlardan elde edilen dokuların HPV yönünden incelenmesi sonucu, 1984 yılından itibaren orofarengal kanserlerin insidansında meydana gelen artışın HPV enfeksiyonundan kaynaklandığını göstermiştir (Zhang ve ark., 2004). Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar ve meta-analizler de özellikle HPV-16 ve HPV-18 alt tiplerinin OSHK ile ilişkisini desteklemektedir (Condotto ve ark.,2017; Jiang ve Dong, 2017).

#### **2.3.2.4. Beslenme**

İçerdiği antioksidan C vitamini, E vitamini ve flavonoidlerden dolayı meyve ve sebze tüketiminin oral kanser riskini düşürdüğünü vurgulayan çalışmalar mevcuttur (Garavello ve ark., 2009; Bravi ve ark., 2013). A vitamini eksikliğinin OSHK ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada karsinogenezin arttığı görülmüştür, ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ve meta-analizler A vitamini ve OSHK arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığını raporlamıştır (Tateya ve ark, 2008; Lodi ve ark.,2016; Pandey ve Mehrotra, 2020). Uzun süreli C vitamini alımı ve kalsiyum takviyesi ile baş- boyun kanseri riskinde azalma gözlenmiştir; ancak bu çalışmada doz-yanıt eğilimleri gözlenmemiştir (Li ve ark., 2012). D vitamini eksikliğinin oral kanserlerle olan ilişkisi araştırılmakta olup, son yıllarda çok sayıda patoloji ile de ilişkilendirilmiştir (Gröber ve ark, 2013; Fathi ve ark., 2019).

#### **2.3.2.5. Lokal Travma ve Oral Hijyen**

Oral kanserlerin gelişiminde lokal travmanın rolü tartışmalıdır. Kronik travmanın, diğer risk faktörleri ve kanserojenlerin varlığında epitel hücrelerinin transformasyonunu indüklediği raporlanmıştır. Ek faktörlerin bulunmadığı travma olgularında yapılan klinik değerlendirmelerde, patolojik inceleme sonucu skuamöz

hücreli karsinom saptanan olgular mevcuttur (Bektaş- Kayhan ve ark., 2014; Piemonte ve ark., 2018).

Oral mikrobiyomun popülasyonu tütün, alkol, betel nut gibi keyif verici maddelerin kullanımı ile değişebilmektedir. İnsan Oral Mikrobiyom Veri Tabanı'nın verilerine göre oral kavitede 700'den fazla bakteri türü bulunmaktadır (<http://www.homd.org>). Hem patojenik hem de kommensal bakteriler homeostazı korumak için birliktedirler; ancak oral mikrobiyom çevresel faktörler ile değiştiğinde OSHK oluşumunda rol oynayabilmektedirler. Özellikle *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* ve *Streptococcus mitis* varlığı OSHK gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Bu bakterilerin oluşturduğu metabolitler, epitel hücrelerinde kalıcı genetik değişiklikleri indükleyebilir. Patojenik biyofilmlerin oluşmasını engellemek ya da öncesinde oral kavitede yerleşik olarak bulunan biyofilmleri uzaklaştırmak için farklı tedavi stratejileri gerekmektedir (Chattopadhyay ve ark.,2019).

Ağız gargaralarında yüksek alkol içeriği geçmişte oral kanserle ilişkilendirilmiştir. Daha yakın tarihli çalışmalar, alkollü gargaraların günlük kullanımının artmasıyla kanser riskinde bir artış olmadığını ve anlamlı bir ilişki saptanamadığını göstermiştir. Ancak bu gargaraların alkol içeriğinin direkt bir etkisi olmasa da, indirekt olarak oral mikrobiyom üzerinde oluşturduğu değişiklikler göz önüne alınarak uzun süreli kullanımlarına karşı dikkatli olunmalıdır. (Gandini ve ark., 2015).

### **2.3.2.6. Oral Potansiyel Malign Lezyonlar**

#### **2.3.2.6.1 Lökoplaki**

Oral mukozanın kanser riski taşımayan diğer beyaz lezyonları ayırt edildiğinde, başka bir diagnostik tanımlama yapılamayan beyaz plak şeklindeki lezyonlara lökoplaki denir. Dünya genelinde prevalansı %1-3 arasındadır ve daha çok beşinci ile yedinci dekatta görüldüğü raporlanmıştır (Villa ve Woo, 2017).

Lökoplaki, klinik olarak homojen ve homojen olmayan olarak iki tipte görülebilir. Homojen lökoplaki, lezyonun tamamında aynı görünüme sahip, beyaz, iyi sınırlanmış bir plak ile karakterizedir. Yüzey dokusu pürüzsüz ince yüzeyden, kalın ve pürtüklü bir yüzeye sahip mukoza görünümüne kadar değişebilir. Homojen olmayan oral lökoplakide ise lezyon yüzeyi oldukça düzensizdir, beyaz keratotik alanlar arasında kırmızı kadifemsi plaklar görülebilir. Oral mukozanın tüm bölgelerinde hem homojen

hem de homojen olmayan lökoplakilere rastlanılabilir (Carrard ve ark., 2013). Homojen lökoplakiler daha yaygın görülür ve genellikle benignidir. Homojen olmayan lökoplakilerin ise malign transformasyon riski daha fazladır. Bazı araştırmacılar homojen olmayan lezyonların malign transformasyon riskini eritroplakilere benzer olarak değerlendirmektedir (Villa ve Woo, 2017).

Lökoplakilerin bir alt tipi olan proliferatif verrüköz lökoplaki (PVL), lezyonları oral kavite içinde yaygın papillomlara benzer olduğundan bu adı almıştır; malign transformasyon potansiyeli ise lökoplakilerden çok daha fazladır. PVL, homojen bir lökoplaki olarak başlayabilir, ancak zamanla çeşitli derecelerde displazi içeren verrüköz bir görünüm geliştirebilir. Genellikle kadınlarda ve ileri yaşta görülür ve başlangıcı en sık alt çene diş etlerinde saptanmıştır (Carrard ve ark., 2013). Yüzey şekli olarak oral papillomlarla benzerlik göstermesi nedeniyle, proliferatif verrüköz lökoplakinin viral bir etyolojiye sahip olduğu şüphesi oluşmuş, ancak bu ilişki randomize kontrollü deneylerle doğrulanmamıştır (Müller, 2017).

#### **2.3.2.6.2 Eritroplaki**

Eritroplakiler oral mukozal membranlarda meydana gelen, başka bir patoloji ile açıklanamayan kırmızı kadifemsi yama şeklindeki eritamatöz lezyonlardır. Eritroplaki, lökoplaki kadar yaygın değildir; genel popülasyondaki prevalansı çok iyi bilinmemekle birlikte %0,02 ile %0,2 arasında olduğu bildirilmiştir. Risk faktörleri, OSHK ile neredeyse tamamen aynıdır (Villa ve ark, 2011). Eritroplakinin malign transformasyon oranı tam olarak bilinmemektedir, ancak lökoplakiden çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir, çünkü eritroplakilerin %85 kadarı biyopsi sırasında karsinoma in situ ve invaziv karsinom dahil olmak üzere histolojik malignite belirtileri gösterir (Abati ve ark., 2020). Bu nedenle bazı araştırmacılar, beyaz bileşenleri olsa da olmasa da kırmızı ve kadifemsi görünen bir oral mukoza lezyonunun, aksi kanıtlanana kadar en azından karsinoma in situ olarak kabul edilmesi gerektiğini iddia etmektedir (Maymone ve ark., 2018).

#### **2.3.2.6.3 Oral Liken Planus**

Oral liken planus (OLP) deri ve mukoza membranlarını etkileyen yaygın, kronik bir enflamatuvar hastalıktır. OLP'nin tahmini prevalansı %0,5-2 arasında raporlanmıştır; genellikle 30-60 yaş arası hastalarda görülür ve kadın/erkek oranı

2:1'dir. Etiyolojisi tam olarak bilinmese de genetik yatkınlık, psikolojik faktörler ve travmanın etyopatogeneizde etkili olduğu düşünülmektedir. OLP'nin ilk malign transformasyon olgusu 1900'lerin başında raporlandığından beri bu konuda birçok epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Çalışmaların sonuçları değişkenlik gösterse de ortalama malign transformasyon oranı %0,2-4 arasında raporlanmıştır (Alrashdan ve ark., 2016).

Klinik olarak OLP'nin retiküler, plak tipi, atrofik, eroziv/ülseratif, papüler ve büllöz olmak üzere altı adet alt tipi vardır. Retiküler, eroziv/ülseratif ve plak benzeri alt tipler daha sık görülmektedir. OLP'nin en bilinen formu olan retiküler lezyonlar genellikle asemptomatiktir ve sıklıkla bukkal mukozada Wickham çizgileri olarak adlandırılan hafif kabarık, beyazımsı-gri, örümcek ağı şeklinde bir klinik görünüm verir. Oral mukozal yüzeylerde klasik retiküler çizgilerin yokluğunda, OLP'yi klinik olarak teşhis etmek zordur, bu nedenle tanının histolojik olarak doğrulanması gereklidir (Olson ve ark., 2016).

OLP'nin eroziv formu, enflamasyon veya epitel incelmesinin neden olduğu eritem ile ortaya çıkabilir ve lezyonun çevresi retiküler keratotik çizgilerle çevriliyken ülserasyon ya da psödomembran oluşumu da görülebilir. Atrofik ve eroziv/ülseratif OLP lezyonları nadiren spontan olarak remisyona girer ve benzer klinik özellikleri paylaşan diğer vezikülo-büllöz hastalıklarla ayırıcı tanısının konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır. OLP'nin plak formu, beyaz, homojen, hafif kabarık, çok odaklı, pürüzsüz bir lezyon olarak görüldüğü için lökoplakiye benzer; genellikle dil ve bukkal mukozayı etkiler. Genel olarak oral mukozada büllöz ve papüler formlar daha nadir gözlemlenmektedir (Olson ve ark., 2016).

#### **2.3.2.6.4 Oral Submukozal Fibrozis**

Oral submukozal fibrozis (OSF), oral mukozanın kronik fibrotik bir lezyonudur. OSF, etkilediği dokularda fibroelastisite kaybı ile karakterizedir, bu durum da klinikte dilin hareketliliğini ve ağız açıklığını etkileyebilen fibröz bantlar olarak seyir gösterir. Bu durum en yaygın bukkal mukozayı ve dili etkiler, dudak, damak ve diş etlerinde daha nadir görülür (Maymone ve ark., 2018). Başlangıçta idiyopatik olduğu düşünülen OSF'in, betel nut, çığneme ile demir, çinko ve vitamin eksiklerini içeren çok faktörlü bir etyolojiye sahip olduğu düşünülmektedir (Arakeri ve Brennan, 2013). Malign transformasyon oranı %9 olarak raporlanmıştır (Maymone ve ark., 2018).

### 2.3.2.6.5 Oral Mukozanın Diğer Potansiyel Malign Lezyonları

Oral mukozanın diğer potansiyel premalign lezyonları arasında diskoid lupus eritematozus, aktinik keratoz, konjenital diskeratoz, epidermolizis bülloza ve kronik kandida enfeksiyonları bulunmaktadır (Abati ve ark., 2020).

### 2.3.2.7. Diğer Risk Faktörleri

Ultraviyole ışınları cilt kanseri için bilinen bir risk faktörüdür. Bu ışınların karsinogenez mekanizmasında DNA hasarı, mutagenizasyon ve HPV gibi virüslerle etkileşim dahil olmak üzere bir çok biyolojik mekanizma mevcuttur. Bu ışınlar oral kavite ve orofarenks kanserleri ile ilişkilendirilmeler de, özellikle alt dudak kanserlerinin etiolojisinde risk faktörü olarak yer alırlar. Özellikle çiftçilik, ormancılık, balıkçılık, posta dağıtımı gibi dış mekanlarda çalışmayı gerektiren meslek sahiplerinin dudak kanseri açısından büyük risk altında olduğu tespit edilmiştir. Dudakta en sık etkilenen ve skuamöz hücreli karsinom gelişen bölge vermilyon hattıdır ve patolojik incelemelerde ultraviyole ışınlarının bu bölgedeki kanserlerde etkili olduğu saptanmıştır (Johnson ve ark., 2019).

Hematopoetik kök hücre nakli geçiren özellikle de lösemi ve lenfomaya sahip hastalar oral kanser açısından yüksek risk altındadır. Bu hasta popülasyonlarının OSHK riskinde 20 kat artış olduğu bildirilmiştir (Socié ve ark., 2012). Ayrıca bu hastalarda allojenik hematopoetik kök hücre naklinden sonra gözlenen bir immünolojik fenomen olan Graft-versus-host hastalığı (GVHH) görülebilmektedir. GVHH kan ürünlerinin transfüzyonu, solid organ nakli veya olog hematopoetik kök hücre naklinden sonra görülebilen nadir bir hastalıktır. Normal enflamasyonun şiddetli ve istenmeyen bir formu olarak görülebilir. Donör lenfositler, enflamasyonu destekleyecek şekilde yabancı antijenlerle etkileşime girer. Bu hastalıkta ölüm oranı %15'e kadar çıkabilmektedir. Akut ve kronik klinik seyir ile çoklu organ tutulumu gösterebilen ve farklı tedavi seçeneklerine sahip olan komplike bir hastalıktır. En sık görülen formu kutanöz GVHH 'tur. Oral bölgede de likenoid lezyonlar, hiperkeratotik plaklar ve skleroza bağlı olarak sekonder gelişen sınırlı ağız açıklığı ile seyredebilir. Bu lezyonlar OSHK için hazırlayıcı bir zemin oluştururlar (Ferrara ve Chaudhry, 2018).

OSHK, hematopoetik kök hücre nakli ile ilişkili immünoşüpresyonu olan hastalarda daha agresif davranabilir. Bağışıklığı baskılanmış hastalar da nakil geçirmiş hastalar gibi oral kanser için artmış risk grubundadır (Burra ve Rodriguez-Castro, 2015).

Bazı kalıtsal sendromlara sahip hastaların oral kansere yakalanma riski daha fazladır. Fanconi anemisi, Cowden Sendromu, Bloom Sendromu, kseroderma pigmentozum ve konjenital diskeratoz hastalıklarının oral kanserler ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bahsedilen bu genetik sendromlar, tümör süpresör gen hasarına bağlı olarak kanser gelişimine neden olmaktadır (Wang ve ark., 2018).

#### 2.4. Oral Kavite Kanserlerinde Evreleme

Kanserler, özellikle popülasyon düzeyindeki sürveyansının kontrolü, tedavi protokollerinin araştırılması ve yapılacak klinik uygulamalarda bir rehber olması amacıyla oluşturulmuş anatomik temelli TNM (tümör, lenf düğümü, metastaz) evreleme sistemi ile sınıflandırılmıştır. Fransa'da 1940'larda Pierre Denoix tarafından geliştirilen TNM sınıflandırması, kanser evrelemesinin temeli olarak kabul edilmektedir. TNM sistemi, Uluslararası Kanser Birliği ve Amerikan Kanser Birliği Komitesi tarafından 1968'de 23 vücut bölgesine göre düzenlemiştir. Uluslararası Kanser Birliği ve Amerikan Kanser Birliği Komitesi son olarak 2018 yılında 8. Baskıda güncel TNM evreleme sistemi yayımlanmıştır (AJCC, 2018; Tablo 2-2).

**Tablo 2-2: Uluslararası Kanser Birliği ve Amerikan Kanser Birliği Komitesi'nin TNM evreleme sistemi, 2018**

PRİMER TÜMÖR(T)	
<b>T<sub>x</sub></b>	Primeri tespit edilemeyen tümör
<b>T<sub>0</sub></b>	Primer tümör bulgusu yok
<b>T<sub>is</sub></b>	Karsinoma in situ
<b>T<sub>1</sub></b>	2 cm veya daha küçük tümör
<b>T<sub>2</sub></b>	Tümör çapı 2 cm ile 4 cm arasında
<b>T<sub>3</sub></b>	4 cm'den daha büyük tümörler

<b>T<sub>4a</sub></b>	<b>Dudak:</b> Tümörün kortikal kemiğe, inferior alveolar sinire, ağız tabanına veya yüz derisine invaze olması <b>Oral kavite:</b> Tümör sadece maksilla ve mandibulanın kortikal kemiği, dilin (ekstrinsik kasları, maksiller sinüs, yüz derisi gibi komşu yapılara invaze olmuştur.		
<b>T<sub>4b</sub></b>	<b>Çok ileri lokal hastalık;</b> Tümör, mastikatör boşluk, pterigoid plate, kafa tabanı ve/veya internal karotid artere invaze olmuştur.		
<b>REJYONEL LENF NODLARI (N)</b>			
<b>N<sub>x</sub></b>	Tespit edilemeyen reyonel lenf nodu		
<b>N<sub>0</sub></b>	Reyonel lenf nodu metastazı yok		
<b>N<sub>1</sub></b>	Aynı tarafta bir adet metastatik, 3 cm veya 3 cm'den daha küçük lenf nodu		
<b>N<sub>2</sub></b>			
<b>N<sub>2a</sub></b>	Tümörle aynı tarafta, çapı 3 cm ile 6 cm arası metastatik tek lenf nodu		
<b>N<sub>2b</sub></b>	Tümörle aynı tarafta 6 cm'den küçük multiple metastatik lenf nodları		
<b>N<sub>2c</sub></b>	Bilateral yada kontralateral 6 cm'den küçük metastatik lenf nodu		
<b>N<sub>3</sub></b>	6 cm'den büyük metastatik lenf nodu		
<b>METASTAZ (M)</b>			
<b>M<sub>0</sub></b>	Uzak metastaz yok		
<b>M<sub>1</sub></b>	Uzak metastaz var		
<b>EVRELEME</b>			
<b>EVRE 0</b>	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>EVRE 1</b>	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>EVRE 2</b>	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
<b>EVRE 3</b>	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1-3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
<b>EVRE 4<sub>a</sub></b>	T <sub>4a</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1-4a</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
<b>EVRE 4<sub>b</sub></b>	Herhangi T	N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4b</sub>	Herhangi N	M <sub>0</sub>
<b>EVRE 4<sub>c</sub></b>	Herhangi T	Herhangi N	M <sub>1</sub>

(Uluslararası Kanser Birliği ve Amerikan Kanser Birliği Komitesi Sınıflaması, 2018.)

## 2.5. Oral Skuamöz Hücreli Karsinomlarda Tedavi Yöntemleri

OSHK'larda tedavinin seçimi hücre tipine ve farklılaşma derecesine, primer lezyonun lokalizasyonuna ve büyüklüğüne, lenf nodu tutulumuna, lokal kemik tutulumunun varlığına, yeterli cerrahi sınırlara ulaşılma imkanına, metastazların varlığına ve hastanın medikal durumuna bağlıdır. Tedavi kararları konuşma, yutma ve estetiği barındıran orofarengeal fonksiyonları korumanın yanı sıra hastanın medikal ve mental durumunu da etkiler. Ayrıca tedavi boyunca hastaya sağlanan destek, tedavilerin potansiyel komplikasyonlarının kapsamlı olarak değerlendirilmesi, onkoloji ekibinin deneyimi, hastanın kişisel tercihleri ve iş birliği operasyon kararlarını etkiler (Epstein ve Elad, 2015).

Lezyonlar başlangıç evresinde teşhis edilemezse tedavi seçenekleri sınırlı olabilir ve iyileşme olasılığı azalır. Oral kanserlerin tedavisinde temel olarak cerrahi ve radyoterapiden yararlanılır. Sistemik kemoterapi ve hedefe yönelik kemoterapötik tedavi, radyasyon ve cerrahinin temel terapötik yaklaşımları ile birlikte uygulanır ve son yıllarda ileri evre kanserlerin tedavisinde kullanımı yaygınlaşmıştır. T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> evre lezyonları için cerrahi veya radyoterapi kullanılabilir; daha ileri durumlarda ise cerrahi tedaviye ek olarak kombine radyoterapi ile kemoterapi uygulanabilir. Yoğunluk ayarlı radyoterapi (YART), YART'ın daha yeni formu olan görüntü kılavuzlu radyoterapi (GKRT) ve proton terapisi gibi teknik gelişmeler, tükürük bezleri dahil birçok hayati organa gelen yüksek doz ışınlama alanının boyutunu azaltır. Baş- boyun kanserlerinde, özellikle hastalığın ileri evrelerindeki kötü prognoz nedeniyle, hiperfraksiyone radyoterapi ve kombine kemoradyoterapi gibi daha yoğun tedavilere de başvurulmaktadır (Pandit ve ark., 2020).

OSHK şüphesi olan hastalarda kapsamlı bir baş-boyun muayenesi yapılmalıdır. Özellikle oral kavitede yumuşak dokuların detaylı inspeksiyonu ve palpasyonu, olası bir malignitenin erken evrede farkedilmesini sağlayabilir. Bunun yanı sıra oral kanser hastalarının %7'sinde üst sindirim sisteminde ikincil bir lezyon olduğu bildirildiğinden endoskopik muayene de önerilmektedir. Şüpheli lezyonların tanısı için altın standart biyopsidir. Erişilebilen lezyonlara punch biyopsi ya da ince iğne aspirasyon biyopsisi uygulanabilir. Lezyonların yumuşak dokularla ilişkisi ve perinöral yayılmalarını gözlemek için manyetik rezonans görüntüleme, komşu kemiklerle ilişkisinin,

kortikal tutulum ve ekstrakapsüler nodüler yayılımların değerlendirilmesi için bilgisayarlı tomografiden yararlanılmaktadır (Montero ve Patel, 2015).

### 2.5.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavinin temel amacı, primer tümör dokusunun uzaklaştırılması, sekonder olarak da gizli/belirgin lenf metastazlarının boyun diseksiyonu ile eksize edilmesidir. Cerrahi tedavinin yeterli sağlam sınırlara ulaşamadığı durumlar, lokal ve bölgesel nüks riskinin artmasına ve uzun vadede sağkalım oranlarının düşmesine neden olur (Kerawala ve ark., 2016). OSHK cerrahi tedavisinde rezeksiyon sınırlarının artması estetik ve fonksiyonel morbiditelerin artmasına da neden olabilir. Primer tümör rezeksiyonunda, lezyona eşlik eden displazik epiteli saptamak için ek olarak iyot solüsyonu ile vital boyama önerilir. İyot solüsyonu ile etkilenmiş displazik epitel sınırları kahverengi boyanır ve cerraha rehberlik eder. Primer tümörün rezeksiyonundan sonra, oral fonksiyonu ve kozmetik görünümü eski haline getirmek için çoğunlukla rekonstrüktif cerrahi gerekir. Rekonstrüksiyon yöntemleri genellikle deri greftinden mikrovasküler serbest flebe kadar uzanan rekonstrüktif bir süreci kapsamaktadır (Wong ve Wiesenfeld, 2018).

Baş- boyun bölgesi kanserli hastalarda cerrahi tedavi için çeşitli farklı servikal lenf nodu diseksiyonları kullanılmaktadır. Boyun diseksiyonu tekniğinde, skuamöz hücreli karsinomdan kutanöz melanom ve papiller tiroid karsinoma kadar birçok patolojide, bölgesel hastalığın yönetimi için boyun diseksiyonunun rolü hızla gelişmektedir (Kim ve Li, 2019).

Lokal ileri evre kanserlerde servikal lenf nodlarına metastatik yayılım yaygındır ve tedavi rehberleri klinik olarak N0 evrede dahi boyun diseksiyonu desteklenmektedir. Temel olarak tercih edilen cerrahi tedaviler radikal ve selektif diseksiyonları kapsamaktadır. Radikal diseksiyonda tüm lenf nodlarını ve onları çevreleyen yumuşak dokular da dahil olmak üzere eksizyonu içerir, morbidite oranı selektif lenf nodlarına göre daha yüksektir. Selektif boyun diseksiyonunda ise yalnızca metastaz yapma olasılığı fazla olan lenf nodları eksize edilmektedir. Oral kanserlerde selektif boyun diseksiyonları daha sık kullanılmaktadır (Kim ve Li, 2019).

Displazik ve malign lezyonların eksizyonu lazer cerrahisi ile de yapılabilir. Lazer ile cerrahi tedavi avantajı genellikle iyi tolere edilmesi, hastanede yatış süresinin kısılması iken dezavantajı histopatolojik doğrulama için cerrahi sınırların

değerlendirilme imkanını ortadan kaldırmasıdır. Son yıllarda orofarengeal kanserler ve dilin arka bölge kanserleri gibi erişilmesi zor alanlarda transoral robotik cerrahiden de faydalanılmaya başlanmıştır, ancak tüm avantaj ve dezavantajlarının değerlendirilebilmesi için kontrollü klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Park ve ark., 2013; Weiss ve ark., 2019).

### **2.5.2. Radyoterapi**

Radyasyon tedavisi, tek başına bir yöntem olarak uygulanabildiği gibi, kombine olarak radyasyon cerrahisi ve / veya kemoterapi yaklaşımının bir parçası olarak da tedavi amacıyla veya palyasyon için uygulanabilir (Epstein ve Elad, 2015). Palyatif bakımda radyasyon, ağrı, kanama, ülserasyon ve orofarengeal tıkanıklık şikayetlerinin semptomatik olarak rahatlamasını sağlayabilir.

Radyasyonun uygulanmasındaki temel amaç, hücrelerdeki su molekülleri ile etkileşip biyokimyasal süreçlerle etkileşen yüklü molekülleri üretip DNA'ya doğrudan zarar vererek hücreleri öldürmektir. Etkilenen hücreler ölmeseler bile bölünme yeteneklerini kaybeder. Merkezdeki hipoksik tümör hücreleri radyoterapiye göreceli olarak daha az duyarlıdır, ancak periferik hücreler radyasyondan etkilendiklerinden ve dolayısıyla sonraki radyasyon fraksiyonlarına karşı daha duyarlı olduklarından daha iyi oksijenlenebilirler. OSHK'lar radyosensitif olarak kabul edilir ve genellikle tümörün diferansiyasyon derecesi arttıkça, radyoterapiye verdiği yanıt da buna paralel olarak artmaktadır. Ekzofitik ve iyi oksijenlenmiş tümörler daha radyosensitiftir, küçük büyüme fraksiyonlarına sahip büyük invaziv tümörler genellikle daha az duyarlıdır (Grégoire ve ark., 2018).

Radyasyon terapisindeki yeniliklerle, verilecek doz üç boyutlu olarak hedef dokuların şekline uyumlanıp çevredeki normal dokulara gelen dozu azaltır ve değişen yoğunluklarda radyasyon ışınları kullanabilir. YART ve diğer gelişmiş ışın tedavileri, bu tümörlerin beyin sapı, optik kiazma ve tükürük bezleri gibi kritik yapılara yakınlığı göz önüne alındığında baş- boyun maligniteleri için idealdir. YART'nin, hastalık kontrolünde standart radyoterapiyle kıyaslanabilir olduğu, akut ve geç toksisiteyi ise azalttığı gösterilmiştir. Işın verilen alanların ve dozların modifiye edilmesinin üzerine, tedavi esnasındaki radyasyonu değiştirme özelliği eklenmiş ve görüntü kılavuzlu radyoterapi (GKRT) tanıtılmıştır (Hsieh ve ark., 2016).

Kombine tedaviler genellikle radyoterapi, cerrahi ve kemoterapiyi içerir. Radyoterapi (değişen fraksiyonlama ve farklı radyasyon kaynakları kullanma), cerrahi ve kemoterapi (ajan seçimi ve zamanlama) ile ilgili parametreler dikkate alınmalıdır. Radyasyon ameliyat öncesi, ameliyat sonrası veya planlı bir bölünmüş yol yaklaşımıyla kullanılabilir, ancak en iyi yaklaşım konusunda tartışmalar vardır. Ameliyat öncesi radyasyonun avantajları periferik tümör hücrelerinin tahrip edilmesi, subklinik hastalığın potansiyel kontrolü ve ameliyat edilemeyen lezyonların ameliyat edilebilir lezyonlara dönüştürülme olasılığıdır. Radyoterapinin, post-operatif dönemde yara iyileşmelerinde sorunlar, kemikte osteoradyonekroz, özellikle baş-boyun radyoterapisinde çiğneme kaslarını içerdiğinde trismus, tükürük bezlerini içerdiğinde kserestomi meydana getirmesi önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır. Radyoterapi ve cerrahinin kombinasyonunun takiben kemoterapinin eklenme amacı rezeksiyon sınırında kalan hücreleri ortadan kaldırmak, potansiyel bölgesel ve sistemik yayılımı engellemektir (Carneiro-Neto ve ark., 2017).

#### **2.5.2.1. Brakiterapi**

Brakiterapi, interstisyel ve intrakaviter implantların primer tümör alanlarına yakın bölgelere yerleştirilerek radyoaktif kaynaklarla tedavi edilmesi temeline dayanır. Özellikle ağız boşluğunun ön üçte ikisinde lokalize tümörlerde, belirli bölgelere arttırılmış radyasyon dozlarını uygulamak amacıyla ya da nüksü takiben tedavi uygulanmaktadır. Tedavide sezyum, iridyum ve altın izotoplarından faydalanılır (Mazeron ve ark., 2009; Alva ve ark., 2020).

Radyasyon ışınlarını iletme için doğrudan implante edilmiş kaynaklar kullanılabilir ya da önceden yerleştirilmiş kateterler veya kılavuz tüpler kullanılabilir. Meydana gelebilecek doku nekrozlarının sıklığı, tedavi edilen hacme, fraksiyon boyutuna, toplam radyasyon tedavisi dozuna ve radyoaktif implantın kemiğe yakınlığına bağlıdır (Mazeron ve ark., 2009; Alva ve ark., 2020).

#### **2.5.3. Kemoterapi**

Kemoterapi, OSHK tedavisinde son dönemlerde daha sık kullanılmaya başlanan bir tedavi modalitesidir. OSHK tedavisinde, cerrahi veya radyoterapi öncesinde indüksiyon kemoterapisi, tedaviyle eş zamanlı olarak kemoradyoterapi ve lokal tedaviden sonra adjuvan kemoterapi olarak uygulanabilir (Epstein ve Elad, 2015).

İndüksiyon kemoterapisinin amacı, başlangıçtaki tümörün küçültülmesi ve mikrometastazların erken aşamada tedavisini sağlamaktır. İndüksiyon kemoterapisi tedavi protokollerinde henüz standart hale gelmemiştir; oldukça başarılı sonuçlar elde edildiğini gösteren çalışmalar olsa da sağkalım oranları henüz net olarak belirlenmemiştir (Blanchard ve ark., 2013; Gau ve ark., 2019).

Adjuvan kemoterapi birçok kanser türünde metastatik rekürrens insidansını azaltmak için ameliyat sonrası uygulanır ancak oral kanser cerrahileri sonrasında standart bir rejim olamamıştır. Baş- boyun kanserli hastaların tedavisinde kemoterapinin rolünü inceleyen ve 17.346 hastayı içeren büyük bir meta-analizin en son güncellemesinde anlamlı bir etki görülmediği raporlanmıştır (Pignon ve ark., 2009; Hartner, 2018).

Tedaviyle eş zamanlı olarak uygulanan kombine kemoradyoterapi protokolleri ise artık üçüncü, dördüncü evre tümörlerde primer tedavi için ya da cerrahi sonrası iyileşme göstermeyen tümörler için standart tedavi protokolünde yer almaktadır. Kombine kemoradyoterapi uygulaması yaygınlaştıkça bu tedavilerle ilişkili morbidite oranları da daha belirgin hale gelecektir (Blanchard ve ark., 2013; Hartner, 2018).

Baş- boyun kanserlerinde tek başına veya kombinasyon halinde uygulanan başlıca ajanlar platin türevleri (sisplatin ve karboplatin), 5-fluorourasil, taksan türevleri, ve hidroksiüredir (Epstein ve Elad, 2015).

### **2.5.3.1. Sisplatin**

Sisplatin 1844 yılında İtalyan kimyager Michele Peyrone tarafından sentezlenmiştir ve kimyasal yapısı ilk olarak 1893 yılında Alfred Werner tarafından açıklanmıştır (Dasari ve Tchounwou, 2014).

1965 yılında biyofizik uzmanı Barnett Rosenberg elektrik veya manyetik dipol alanlarının hücre bölünmesine dahil olup olmayacağını araştırmak için bakteri ve memeli hücrelerine elektromanyetik radyasyon uygulamaktaydı. Escherichia coli bakterilerinin kullanıldığı deneylerde yanlışlıkla, büyüme odasına bir dizi platin elektrot dahil edilmiş, deneylerin sonunda bakterilerin çoğalamadıkları, hatta boyutlarında 300 kat küçülme olduğu gözlenmiştir. Daha sonra detaylı incelemeler yapılmış ve bu etkinin elektrik alanından değil, platin elektrotlarından kaynaklanan elektroliz ürünlerinden kaynaklandığı keşfedilmiştir (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Bu keşif üzerine Rosenberg, hücre bölünmesini engelleyen bir bileşiğin tümöral yapılarda da kullanılabilceğini düşünerek farelere tümör nakledip intraperitoneal olarak sisplatin uygulamış ve belirgin tümör gerilemesi olduğunu raporlamıştır. Sisplatin, 1971 yılında kanser tedavisi için kullanmaya başlanmıştır ve 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onay almıştır (Kelland, 2007). Günümüzde over, testis, baş-boyun, prostat, meme ve akciğer kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dhar ve ark., 2011).

Sisplatin temel olarak hücre içine pasif difüzyon ile taşınır. Bunun yanı sıra bakır taşıyıcı proteinler, organik anyon ve katyon taşıyıcıları da sisplatinin hücreye girmesinde rolü olan diğer yollardır (Eljack ve ark., 2014). Sisplatin hücreye girdiğinde aktive olur. Sisplatin üzerinde yer alan klorür atomları, su atomları ile yer değiştirir. Meydana gelen bu hidrolize ürün, nükleik asitlerin üzerindeki nitrojen donör atomları ve proteinlerin üzerindeki sülfhidril grupları dahil herhangi bir nükleofil ile reaksiyona girebilen güçlü bir elektrofildir. Sisplatin pürin kalıntıları üzerindeki N7 reaktif merkezine bağlanarak kanser hücrelerinde deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı oluşturur, hücre bölünmesini bloke eder ve apoptik hücre ölümünü sağlar (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Sisplatin, solid tümörler için dünyada en yaygın kullanıma sahip kemoterapötik ajan olsa da 40 kadar doza bağlı yan etkisi bilinmektedir. Bu yan etkiler arasında böbrek toksisitesi, ototoksisite, gastrointestinal toksisite, kardiyotoksisite, hepatotoksisite, periferal nöropati, bulantı, kusma, kan hücreleri ve minerallerde azalma, buna bağlı olarak da enfeksiyon, anemi ve kanamaya yatkınlık, mukozit, stomatit, tat ve iştah kaybı, saç dökülmeleri sayılabilir (Qi ve ark., 2019).

### **2.5.3.2. 5- Fluorourasil (5- FU)**

5- FU, urasilin C-5 pozisyonundaki hidrojeninin yerine flor gelmesi ile oluşan bir antimetabolittir. DNA'daki timin replasmanının neden olduğu timin-urasil / 5-FU değişimi sonuç olarak adenin-urasil / 5-FU baz çiftlerinin oluşumuna yol açar (Vertessy ve Toth, 2009). 5-FU, antineoplastik aktiviteye sahip olduğu bildirilen ilk kemoterapötik ilaçlardandır. 5-FU, urasilin tümörler tarafından tutulumundan faydalanmak amacıyla ilk olarak 1957 yılında Heidelberger tarafından sentezlenmiştir. 5-FU ve derivasyonları günümüzde mide, baş- boyun, kolorektal, akciğer, meme ve pankreas kanserlerinde kullanılmaktadır (Shirasaka, 2009; Vodenkova ve ark., 2020).

5-FU, antitümör etkilerini esas olarak timidilat sentazın inhibisyonu yoluyla gösterir ve DNA replikasyonu için gerekli hücre içi deoksinükleotid havuzlarının bozulmasına yol açar. Bunun yanında ikincil bir etki olarak vücutta fluorouridilata dönüşerek ribonükleik asit (RNA) yapısına katılır ve RNA fonksiyonlarını bozar, protein sentezini inhibe eder (Vodenkova ve ark., 2020).

### **2.5.3.3. Hedefe Yönelik Kemoterapi**

Son yüzyıl itibarı ile genomik, proteomik, metabolomik ve diğer biyomedikal bilimler oldukça hızla gelişmiştir. Buna bağlı olarak büyüme faktörü reseptörleri, sinyal transdüksiyonu veya transkripsiyon aktivasyonunda yer alan anahtar moleküller, kanser hücrelerinin proliferasyonu, bölünmesi, invazyonu ve metastazı ile ilgili genler gibi kansere özgü hedefe yönelik tedaviler, araştırmalarda oldukça önemli bir noktaya ulaşmıştır ( Liu ve ark., 2019).

Hedefe yönelik terapilerde, geleneksel terapötik yöntemlerden farklı olarak, yüksek seçicilik, düşük toksisite ve yüksek terapötik indeks avantajlarına sahip spesifik kanserojen bölgeleri etkileyen terapötik ilaçlar uygulanır. Çalışmalar, bu tür bir tedavinin, tümör hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek veya cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve diğer tedavi önlemleriyle birleştirilerek tümör hastalarının 5 yıllık sağkalım oranını iyileştirebileceğini kanıtlamıştır (Ribeiro ve ark., 2014; Liu ve ark., 2019). Son yıllarda hedefe yönelik terapötik ilaçlar kanser tedavisinde oldukça iyi sonuçlar elde etmiştir ve araştırmalarda ilgi odağı olmuştur.

#### **2.5.3.3.1 Epitelyal Büyüme Faktör Reseptörünü (EBFR) Hedefleyen İlaçlar**

Epitelyal büyüme faktör reseptörü (EBFR), insan epidermal büyüme faktörü tirozin kinaz reseptör ailesine ait bir sitoplazmik transmembran proteinidir. Epidermal büyüme faktörü (EBF), dönüştürücü büyüme faktörü- $\alpha$ , nörogulin, betaselülin, heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü (HB-EBF) ve epiregulin gibi endojen ligandlar, homolog veya heterojen dimerler oluşturmak için EBFR'nin ekstraselüler alanı ile bağ kurar. Bu dimerler hücre içi protein tirozin kinazlarını aktive eder, sitoplazmik alandaki anahtar tirozin kalıntılarının otofosforilasyonuna yol açar ve ardından aşağı akım sinyal yollarını başlatır, bu yolak hücrelerin proliferasyonunu, metastazını, anti apoptozisini artırır ve tümör hücrelerinin anjiyogenezine yol açar (Mak ve William, 2014).

Çalışmalar, baş ve boyundaki invaziv skuamöz hücreli karsinomların % 80'inden fazlasının, sıklıkla tümör invazyonu ve metastaz, radyoterapi ve kemoterapiye artan direnç, azalmış sağkalım oranı ve kötü prognoz ile ilişkili olan EBFR ile aşırı eksprese edildiğini göstermiştir (Dai ve ark., 2014; Riberio ve ark., 2014). Agra ve arkadaşları, EBFR eksprese etmeyen tümörlü hastaların, EBFR eksprese eden tümörlü hastalara kıyasla ameliyat sonrası daha iyi terapötik sonuçlara sahip olduğunu gözlemlemiş, 3 yıllık sağkalım oranının %27.2 daha yüksek olduğunu raporlamıştır (Agra ve ark., 2008).

EBFR'lere karşı klinikte iki tür ilaç uygulanmaktadır. Bir grup hücre dışı ligand bağlanma alanını tanıyan ve reseptör aktivasyonuna müdahale eden, setuksimab ve nimotuzumab gibi monoklonal antikorlardır; diğer grup ise sitoplazmik alana bağlanan ve aşağı akış sinyal iletimini etkileyen gefinitib, erlonitib ve afatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleridir (Goerner ve ark., 2010; Liu ve ark., 2019).

#### **2.5.3.3.2 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünü (VEBF) Hedefleyen İlaçlar**

Tümör anjiyogenezi, tümörlerin lokal büyümesi, invazyonu ve metastazında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, anjiyogenezin inhibe edilmesinin baş- boyun kanserlerinin tedavisinde etkili olduğu düşünülmektedir (Okada ve ark., 2010). VEBF, vasküler geçirgenliğin artmasında rol oynayan, endotelial hücreye özgü mitojen ve anjiyogenik bir faktördür. Tümör anjiyogenezinin ana moleküllerinden biri olarak kabul edilmiştir ve baş- boyun kanserlerinde yüksek oranda eksprese edilir (Stîngă ve ark., 2011). VEBF sinyalleri, endotel hücre geçirgenliğini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını yöneten ana sinyal reseptörleri olduğuna inanılan iki sınıf endotel hücre reseptörüne bağlanarak iletir. Ek olarak VEBF, doğrudan endotel büyüme faktörü rolüyle anjiyogenez ve matris oluşumunu teşvik etmektedir; bu da plazma protein ekstrasvazasyonuna ve fibrin birikmesine yol açmaktadır. VEBF ve reseptörlerine karşı bevacizumab gibi monoklonal antikorlar veya sorafenib ve vandetanib gibi çoklu kinaz inhibitörleri kullanılır (Hsu ve ark., 2014; Fury ve ark., 2016).

#### **2.5.3.4. Kemoterapide Kombine Protokoller**

Sitotoksik kemoterapötikler ve hedefe yönelik tedavi kombinasyon halinde kullanılabilir (Tablo 2-3). Kombinasyon halinde kullanılan ilaçların sayısının artırılması, kemoterapi uygulamalarının artırılması, kemoterapötiklerin modülatörlerinin kullanılması, aralıklı ve sürekli infüzyon gibi uygulamaların modifiye edilmesine

yönelik araştırmalar devam etmektedir. Tümörün lokalizasyonu, diferansiyasyonu, HPV varlığı ve etiyolojideki farklılıklar, tedaviye yanıt ve prognoz nedeniyle ele alınması gereken temel durumlardır (Huang ve O’Sullivan, 2013; Epstein ve Elad, 2015).

**Tablo 2-3: İleri evre oral kanserlerde mevcut kemoterapi uygulama protokolü**

Hastanın durumu	Uygulanacak kemoterapi rejimi
<b>Primer sistemik terapi için uygulanan kemoradyoterapi</b>	1., 22. Ve 43. Günlerde 100 mg/m <sup>2</sup> intravenöz sisplatin
	6-7 hafta boyunca haftalık 40-50 mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin
	Radyasyon terapisi başlamadan 1 hafta önce 400 mg/m <sup>2</sup> IV cetuksimab yükleme dozu, ardından haftalık 250 mg/m <sup>2</sup> IV cetuksimab
	Radyasyon terapisine başlamadan bir hafta önce 400 mg/m <sup>2</sup> IV cetuksimab yükleme dozu, ardından haftalık 250 mg/m <sup>2</sup> IV cetuksimab
	1.-4. Ve 22.-25. Günlerde 20 mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin ve 1000 mg/m <sup>2</sup> /g IV 5-Fluorosil infüzyonu
	Radyasyon terapisiyle birlikte 1.-5. Günler arası 800 mg/m <sup>2</sup> IV 5-FU’ya ek olarak 1 gram PO q12h hidroksiüre
	1.-4., 22.-25. Ve 43.-46. Günlerde 70mg/m <sup>2</sup> / g IV karboplatin ve 600 mg/m <sup>2</sup> /g IV 5-Fluorosil infüzyonu
<b>Postoperatif olarak uygulanan kemoradyoterapi</b>	Haftalık 45 mg/m <sup>2</sup> IV paklitaksel ve IV karboplatin AUC 1.5
	1., 22. Ve 43. Günlerde 100 mg/m <sup>2</sup> IV cisplastin ve 6-7 hafta boyunca, haftalık olarak 40-50 mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin
	İlk 3 haftada üç siklus boyunca 75 mg/m <sup>2</sup> IV docetaksel, 100 mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin ek olarak 1.-4. Günler 100 mg/m <sup>2</sup> /g IV 5-FU
<b>İndüksiyon kemoterapisi uygulaması</b>	3-8 hafta sonra radyasyon terapisiyle birlikte 7 hafta boyunca haftalık IV karboplatin AUC 1.5, ardından şartlar uygunsa cerrahi işlem
	İlk 3 haftada dört siklus kez 75 mg/m <sup>2</sup> IV docetaksel, 75mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin ek olarak 1.-4. Günler 750 mg/m <sup>2</sup> /g IV 5-FU, 4-7 hafta sonra radyasyon terapisi
	İlk 3 haftada, üç siklus boyunca ilk gün 175 mg/m <sup>2</sup> IV paclitaksel, ikinci gün 100 mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin ek olarak 2.-6. Günler 500 mg/m <sup>2</sup> /g IV 5-FU, ardından radyoterapi ile birlikte 1., 22., ve 43. Günler 100 mg/m <sup>2</sup> IV sisplatin

#### 2.5.4. Fotodinamik Terapi

Fotodinamik terapi, erken evre malignitelerin ortadan kaldırılması ve geç evre tümörlü hastalarda semptomların hafifletilmesi için kullanılan bir antitümör uygulamasıdır. Tedavi, ışığa duyarlılaştırıcı olarak bilinen ve belirli bir dalga boyunun

ışığı ile aktive edilene kadar deaktif olan foto-reaktif ilacın sistemik veya topikal uygulamasını içerir. Fotosensitizerler genellikle mitokondri ve lizozomlar dahil olmak üzere hücrel organellerde lokalizedir ve tümör hücreleri için bazı seçiciliğe sahiptir. Fotosensitizerin hafif aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinin üretimine ve doğrudan tümör hücresi ölümüne yol açar. Baş-boyun kanserlerinde fotodinamik tedavinin cesaret verici bazı ön sonuçları olmasına rağmen, rutin tedavi olarak kabul edilmemektedir (Figueira ve Veltrini, 2017; Civantos ve ark., 2018; Meulemans ve ark., 2019).

### **2.5.5. Gen tedavileri**

Gen tedavileri oral epitel lezyonlardaki displaziyi tersine çevirmek amacıyla araştırılmaktadır. Değerlendirilen yöntemler arasında intihar gen terapisi, immünoterapi, onkolitik virüs terapisi, tümör anjiyogenezinin inhibisyonu, gen silme terapisi ve antisens RNA bulunmaktadır. Oral kanserlerde p53 genindeki yüksek mutasyon oranı göz önüne alındığında, çoğunlukla adenoviral vektörlerle p53 genine odaklanan gen terapisi ümit vermektedir. Bu gene ilave hedef genler ve vektörler araştırılmaktadır ancak bu yaklaşımların hiçbiri güncel klinik pratiğinde uygulanmamaktadır (Farmer ve ark., 2019).

### **2.5.6. İmmünoterapi**

İmmünoterapi, hastaların bağışıklık sistemini harekete geçirerek vücudun tümörlere karşı savunmasını geliştiren bir terapidir ve kanser tedavisinde giderek daha stratejik bir konuma gelmiştir. Programlanmış hücre ölümü reseptörü-1 (PD-1) ve T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar ve B hücrelerinde eksprese edilir. Ayrıca B7-H1 veya CD274 olarak da bilinen programlanmış hücre ölümü ligandı 1 (PD-L1), hücrel bağışıklıkta önemli düzenleyici işlevlere sahip ortak uyarıcı bir moleküldür. PD-L1 ile PD-1'in bağlanması, efektör T hücrelerinin yanıt vermemesine ve / veya apoptozuna yol açarak tümörün immün kaçışına neden olur (Liu ve ark., 2019). Araştırmacılar, oral kanser hastalarının %50-90'ının aşırı PD-L1 ekspresyonu gösterdiğini bildirmiştir (Mishra, 2017). PD-L1 ve PD-1'in artan ekspresyonu ayrıca servikal lenf nodu metastazı ile pozitif korelasyon göstermiştir ve bunların birlikte ekspresyonu OSHK, melanom ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli malign tümörlerin oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (Brahmer ve ark., 2012; Maruse ve ark., 2018). T hücreleri üzerindeki PD-1'in kanser hücreleri üzerindeki PD-L1 ile etkileşimini hedefleyen bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin, ileri evre OSHK'lı

hastaların hayatta kalma süresini uzattığı gösterilmiştir. Bir araştırmada, farelerde oral karsinojenik modelin incelenmesi yoluyla, anti- PD-1 tedavisinin farelerde oral lezyonları önemli ölçüde azalttığı ve onların malign ilerlemesini önleyebileceği, böylece PD-1'in bloke edilmesinin oral prekanseröz lezyonları kontrol edebileceği tezi savunulmuştur (Wang ve ark., 2017)

PD-1'i hedef alan iki ilaç pembrolizumab ve nivolumab ileri melanomun tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır ve melanomlu hastalarda ilerlemesiz sağkalım ve toplam sağkalımı önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir (Mann ve ark., 2017). Monoklonal bir antikör olan pembrolizumab, 2016 yılında rekürrent veya metastatik baş- boyun kanseri hastaları için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır (Brower, 2017; Mann ve ark., 2017). 2016 yılında, Amerikan Kanser Derneği, platine dirençli baş- boyun kanseri hastaları için bir faz III klinik nivolumab denemesinin sonuçlarını yayınlamıştır. Nivolumabın, üç tek ajanlı kemoterapiden biri olan dosetaksel, metotreksat veya setuksimab alan hastalara kıyasla ölüm riskini %30 azalttığı, bir yıllık sağkalım oranını %36'ya çıkarttığı raporlanmıştır (ACS, 2016). Lokal olarak ilerlemiş OSHK ve diğer baş- boyun kanserleri için kemoterapi ve / veya radyoterapi ile kombinasyon halinde nivolumabın etkinliğini değerlendirmek için çalışmalar devam etmektedir (Liu ve ark., 2019)

### **2.5.7. İlaçların Yeniden Konumlandırılması**

1928'de ilk antibiyotiğin keşfi ile küçük moleküllü ilaçların bakterileri öldürebileceğinin farkına varılmıştır. O günden sonra antifungal, antiparazitik ve antiviral ajanların keşfi de bu ilkeye bağlı olarak ilerlemiştir ve 20. yüzyıl, her biri belirli bir patojen sınıfına özgü çok sayıda küçük moleküllü antimikrobiyalin geliştirilmesine tanık olmuştur. 2020 yılında ise bu paradigma, viral bir hastalığa karşı bol miktarda antibiyotik ve antiparazitin kullanıldığı SARS-CoV-2 pandemisi nedeniyle tüm dünya tarafından sorgulanmıştır. Küresel ölçekte ilk kez, küçük moleküllü ilaçlar orijinal antimikrobiyal sınıflandırmalarının dışında kullanılmıştır ve küresel sağlık acil durumlarına uygun terapötiklerin eksikliği ortaya çıkmıştır (Pushpakom ve ark., 2019; Harrison, 2020).

2004'te Ashburn ve Thor, "İlaçların yeniden konumlandırılması: mevcut ilaçlar için yeni kullanımların belirlenmesi ve geliştirilmesi" başlıklı dönüm noktası niteliğindeki makalelerini yayınlamışlardır ve ilaçların yeniden konumlandırılması

sonucundaki fırsatları özetlemişlerdir. Yazarlar, ilacın yeniden konumlandırılmasının, yeni bir aktif madde arayarak geleneksel ilaç keşfi yöntemi olan de novo ilaç keşfine göre büyük faydalar sağlayacağı tezini öne sürmüşlerdir. İlaçla ilgili bilgilerin mevcut olmasından ötürü ilaç gelişiminin daha hızlı olacağını, ilacı geliştirme esnasında da meydana gelecek risklerin azalacağını belirtmişlerdir (Ashburn ve Thor, 2004).

Birçok devlet, ilaçların yeniden konumlandırılması ile ilgili faaliyetlere yatırım yapmaktadır. Örneğin, ABD'de Ulusal İleri Translasyonel Bilimler Merkezi, Mevcut Moleküller için Yeni Terapötik Kullanımları Keşfetme Programını başlatmıştır. Programın amacını, "geliştirme yolundaki birkaç önemli adımı halihazırda geçmiş olan ajanlar için yeni kullanımlar bularak, hastalık için yeni tedaviler bulmanın karmaşık ve zaman alıcı sürecini iyileştirmektir" şeklinde ifade etmiştir. Birleşik Krallık'ta araştırmacılar, Tıbbi Araştırma Konseyi'nin Gelişimsel Yolları Fonlama Projesi altında, klinik çalışmaları yeniden konumlandırılması için fona başvurabilmektedir. Hollanda Sağlık Araştırma ve Geliştirme Örgütü, ilacın yeniden konumlandırılmasıyla ilgili "ilacın yeniden keşfinin uyarılması" adındaki projeye fon sağlamıştır (Langedijk ve ark., 2015).

Ülkemizde de erişkin hastalarda en yaygın görülen glioblastoma multiforme evre IV neoplazmasının tedavisi ve metastatik hücre davranışını incelemek amacıyla, hücre hattında, bir antidepresan olan sertralin ve bir antipsikotik olan penfluridol uygulanmış, her iki ilacın da hücre ölümünü tetiklediği, koloni oluşumunu anlamlı olarak baskılandığını raporlanmıştır (Bartık Keleş, 2019).

#### **2.5.7.1. Baş-Boyun Kanserlerinde Antibiyotiklerin Yeniden Konumlandırılması**

Baş- boyun kanserleri için Amerikan Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı Klinik Uygulama Kılavuzları, 2021 yılının haziran ayında güncellenmiştir. Amerikan Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı kılavuzlarının önceki yinelenmelerinde olduğu gibi, OSHK'un tercih edilen birincil tedavisi cerrahi olmaya devam etmektedir. Yalnız radyoterapi ile eş zamanlı tedavi veya eş zamanlı kemoradyoterapi tedavisinin, özellikle orta evreden ileri evreli hastalığa sahip çoğu hasta için, yerel ve bölgesel nüks riskini azalttığı belirtilmiştir (National Comprehensive Cancer Network, 2021). Altta yatan sebep ne olursa olsun bu kanserlerin teşhisi ve tedavisinin başarısı, yaşam kalitesinin en önemli parçalarından biri haline gelmiştir.

Son yıllarda bu amaçlar doğrultusunda bitkisel, hayvansal kaynaklı maddelerin kanser progresyonu üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalara ek olarak antibiyotiklerin de araştırılmaya başlanması dikkat çekmektedir ve birçok araştırmacı, antibiyotiklerin antineoplastik özellikleri üzerinde çalışmaktadır (Ishii ve ark., 2012; Peiris-Pages ve ark., 2015). Araştırmacıların başlangıç noktası, endosimbiyotik mitokondriyal evrim teorisine dayanmaktadır, çünkü mitokondri, milyonlarca yıl önce ökaryotik hücreler tarafından yutulan bakterilerden gelişmiştir. Bu nedenle protein biyogenezinden sorumlu ortak ribozomlara sahiptir. Birkaç antibiyotik sınıfı, terapötik etkiye dönüştürülebilinen bir “yan etki” olarak mitokondriyal biyogenezi inhibe eder. Bu bağlamda yazarlar, antibiyotiklerin kansere bir hastalıkmiş gibi etki edeceği, çünkü kanser hücrelerinin hayatta kalmasının ve büyümesinin sadece mitokondride arttırılmış protein biyosentezine dayandığını varsaymaktadır (Lamb ve ark., 2015).

Çalışmaların antibiyotikler üzerinde yoğunlaşmasının bir diğer amacı da antibiyotiklerin insan hücreleri için toksik olmamasıdır. Mevcut kemoterapötik ilaçların oldukça fazla yan etkisi mevcuttur. Bundan dolayı hücre düzeyinde yapılan bu çalışmalar sadece teoride değil, pratik anlamda da bir öneme sahiptir. Dahası, araştırmacıların tezleri doğrulanırsa, kanser tedavisi daha etkili, daha iyi tolere edilebilir ve daha ucuz hale gelebilir; böylece keşif, antibiyotiklerin ta kendisi olur (Lamb ve ark., 2015).

#### **2.5.7.1.1 Doksisisiklin**

Tetrasiklin, baskın bakteri türleri olan Actinobacteria ailesine ait Streptomyces cinsi tarafından doğal olarak üretilir (Holmes ve Charles, 2009). Doksisisiklin, önceki tetrasiklinlere kıyasla geliştirilmiş lipofilitesinin sonucu olarak oral biyoyararlanımı ve doku penetrasyonu artmış, geniş bir bakteriostatik etki spektrumuna sahip olan ikinci nesil yarı sentetik bir tetrasiklidir. Genellikle üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni, bronşit, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, gastrointestinal hastalıklar, periodontal hastalıklar ve stafilokok enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılmaktadır (Eisen, 2018). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından dental uygulamalar için onaylanmış tek MMP inhibitörüdür (Tu ve ark., 2008).

Doksisisiklinin etki mekanizması, 30S ribozomal alt birimlerle etkileşim yoluyla mikrobiyal protein sentezinin inhibisyonudur. Buna ek olarak, doksisisiklin matriks metaloproteinazların (MMP'ler) aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir;

bundan dolayı antineoplastik ve aynı zamanda antiinflamatuvar ajan olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Holmes ve Charles, 2009). Bunun yanı sıra meme kanserinde proliferasyonu, kemik metastazını ve MMP-2 ve MMP-9 un jelatinolitik aktivitesini azalttığını, prostat kanserinde tümör hücresi proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazı inhibe ettiğini gösteren çalışmalar vardır. Bir iyonofor gibi davranır, başlıca  $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  olmak üzere bazı iki değerlikli metal katyonlara bağlanır ve hidrofobik membranlar boyunca kolayca taşınan lipitte çözünebilen komplekslerin oluşumuna neden olur (Ali ve ark., 2017).

Genellikle oral yolla alınır ve 16-22 saat süren uzun bir serum yarı ömrüne sahiptir. Doksisiklin iyi tolere edilen bir ilaçtır, oral uygulamadan sonra neredeyse tamamen emilir ve iyi doku penetrasyonuna sahiptir (Holmes ve Charles, 2009). Doksisiklin, seçiciliği zayıf olan kanser kemoterapötik ajanlarının aksine seçici toksisiteye sahiptir. Bu nedenle de kanser hücreleri üzerine etkinliğini araştıran birçok çalışma yapılmıştır (Ali ve ark., 2017).

## 2.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında, genellikle doğal ortamlarının dışında yetiştirildiği süreçtir. İlgili hücreler canlı dokudan izole edildikten sonra dikkatlice kontrol edilen koşullar altında tutulmaktadır. Bu koşullar her hücre tipi için değişmektedir, ancak genellikle sıcaklık, pH değeri, osmotik basınç gibi fizyokimyasal ortamlarını düzenleyen temel besinlerini, büyüme faktörlerini, hormonları ve gazları sağlayan bir substratı içeren besiyerinde oluşmaktadır (Philippeos ve ark., 2012).

Uygulamada hücre kültürü terimi, bitki kültürü, mantar kültürü ve mikrobiyolojik kültür gibi hücreleri büyüten kültür türlerinin yanında, çok hücreli ökaryotlardan, özellikle hayvan hücrelerinden türetilen hücrelerin kültüre edilmesine atıfta bulunmaktadır. Hücre kültürünün tarihsel gelişimi ve yöntemleri, doku kültürü ve organ kültürü ile yakından ilişkilidir (Philippeos ve ark., 2012).

1882 yılında İngiliz fizyolog Sydney Ringer, vücut dışında izole edilmiş bir hayvan kalbinin çalışmasını sürdürmeye uygun olan, sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum klorürlerini içeren tuz çözeltileri geliştirmiştir. 1885'te Wilhelm Roux, embriyonik bir tavuğun medüller plakasının bir kısmını çıkartmış ve bunu birkaç gün boyunca ılık salin solüsyonunda tutarak doku kültürü ilkesini oluşturmuştur. Johns

Hopkins Tıp Fakültesi'nde ve ardından Yale Üniversitesi'nde çalışan Ross Granville Harrison, doku kültürü metodolojisini oluşturarak 1907'den 1910'a kadar yaptığı deneylerin sonuçlarını yayınlamıştır (Yao ve Asayama, 2017).

Hücre kültürü teknikleri, virolojideki araştırmaları desteklemek için 1940'larda önemli ölçüde geliştirilmiştir. Hücre kültürlerinde büyüyen virüsler, aşılarda üretimi için saflaştırılmış virüslerin hazırlanmasına öncülük oynamıştır. Jonas Salk tarafından geliştirilen enjekte edilebilir çocuk felci aşısı, hücre kültürü teknikleri kullanılarak seri üretilen ilk ürünlerden olmuştur. Bu aşı, maymun böbrek hücre kültürlerinde virüsü büyütmeye yöntemini keşfettikleri için Nobel Ödülü alan John Franklin Enders, Thomas Huckle Weller ve Frederick Chapman Robbins'in hücre kültürü araştırmalarıyla mümkün olmuştur (Yao ve Asayama, 2017).

İnsan hücrelerinin kültürü, *in vivo* olarak kolayca mümkün olmayan insan metabolizması ve fizyolojisinin incelenmesine izin veren, yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Hücre kültürü ile, *in vivo* homeostaz sırasında ortaya çıkabilecek sistemik sorunların etkisi olmaksızın tek tek hücre tiplerinin davranışı araştırılabilir. Hücre kültürü genellikle orijinal dokudan enzimatik, mekanik veya kimyasal ayrışma yoluyla, bir birincil kültürden veya bir hücre hattından alınan hücrelerin süspansiyonu şeklinde elde edilir ve deneyleri laboratuvar koşullarında kontrollü bir ortamda gerçekleştirilir. Hücrelerin kontrollü bir şekilde hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi için *in vivo* ortamı başarılı bir şekilde taklit etmelidir. İnsan hücre kültürü uzun yıllardır uygulanmasına ve moleküler biyoloji tekniklerindeki hızlı ilerlemeye rağmen, hâlâ birçok doku ve organın kültürüne olan ihtiyaç devam etmektedir (Aoki ve ark., 2016).

Bu nedenle antibiyotik kullanımını gerektiren ve yaygın kullanımı olan doksisisiklin, skuamöz hücreli oral kanser hattı ve sağlıklı hücre hattı üzerindeki olası antineoplastik etkinliği, 5-Fluorourasil ve sisplatin kemoterapötik ajanları ile kombine ve ayrı ayrı verilerek araştırılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen 34437 proje numaralı “Oral kanser hücre soyunda 5-Fluorourasil ve sisplatin kemoterapötik ajanlarının doksisisiklin antibiyotiği ile etkileşiminin araştırılması” başlıklı tez projemiz kapsamında skuamöz hücreli oral kanser hücre hattı (OSC-19) ve kontrol olarak fibroblastik yapılu insan sağlıklı akciğer hücre hattı (MRC-5) kültüre edilerek 5-Fluorourasil, sisplatin ve doksisisiklin ilaçları ile farklı kombinasyonlarda artan doz ve saatlerde muamele edilmiştir. İlaç muamelesinin hücrelerdeki apoptotik ölüm süreci üzerindeki etkisi Annexin-V yöntemi kullanılarak flow sitometri sistemi ile araştırılmıştır.

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasal Malzemeler ve Kitler

Çalışmada kullanılan OSC-19 ve MRC-5 hücre hatları sırası ile DMEM F-12 (1:1) (Gibco) ve DMEM (Gibco) medyumlarında yetiştirilmiştir. Besi ortamları Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Gibco) eklenmesi ile hücrelerin büyümeleri için uygun hale getirilmiştir. Hücre pasajlama ve dondurma işlemleri için dPBS (Gibco), %25 Tripsin-EDTA (Gibco) ve DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır.

Hücre proliferasyonu tayini ve optimum dozların seçimi için WST-1 sitotoksitesite testi (Roche, Almanya) kiti kullanılmış olup hücrelerde ilaçların indüklediği apoptotik aktivite ölçümü için Annexin V Apoptoz/Nekroz Tayin kiti (Merck Millipore, Amerika) kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Laminar Flow kabin (Fast Safe Elite)
- Inverted Mikroskop (Leica)
- Karbondioksit İnkübatörü (New Brunswick)
- Otomatik Hücre Sayım Cihazı (Life Technologies)
- Soğutmalı Santrifüj (Beckman Coulter)
- Su Banyosu

- MultiScan Spektrofotometre
- Vortex
- Flow Sitometri (NovoCyte)
- Buzdolabı (+4°C, -20°C) ve Derin Dondurucu (-80°C)
- Sıvı Azot Tankı

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Hücre Hatlarının Yetiştirilmesi ve Kültür İşlemleri

Ticari olarak temin edilen ve -196°C sıvı azotta stoklanan OSC-19 (JCRB Cell Bank, JCRB0198) ve MRC-5 (ATCC, CCL-171) hücre hatları stoktan çıkarılarak sırası ile DMEM F-12 ve DMEM besi ortamlarında 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> koşulları altında inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının kaybedilmemesi için besi ortamları iki günde bir değiştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan hücre hatları adherent nitelikte olduğundan besiyeri değişimi sırasında kültür ortamı flasklardan uzaklaştırılmış ve taze besi ortamı eklenmiştir.

Ekimlerinin ardından büyüüp yayılarak tüm flask yüzeyini kaplayan hücreler pasajlama işlemi ile alt kültürlere alınmıştır. Bu işlem için öncelikle besi ortamları aspirasyon ile uzaklaştırılmış, flaskları kültür artıklarından tamamen arındırmak için de 3ml dPBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından hücrelerin flask yüzeyi ile kurdukları protein bağlantılarını ortadan kaldırmak için her bir flaska 3ml tripsin eklenmiş olup 37°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde hücrelerin flask yüzeyi ile olan bağlantılarının kopup kopmadığı mikroskop ile kontrol edilmiştir. Flasklar, tripsin miktarının en az 2 katı kadar besiyeri ile muamele edilerek tripsin aktivitesi inhibe edilmiştir. Flasklardan kaldırılan hücreler pipetör yardımı ile 15ml'lik falkonlara alınmış ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet uygun sayıda flasklara bölünerek pasajlama işlemleri tamamlanmıştır.

Hücre hatları daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere farklı pasaj numaralarından dondurularak stok yapılmıştır. Bu işlem için hücreler tripsinizasyon ile kaldırılmış olup 1500 rpm'de 5 dakikalık santrifüjün ardından hücre pelleti %90 medyum (her hücre hattı için kendi medyumunu) %10 DMSO eklenerek hazırlanmış olan

dondurma solüsyonu ile homojenize edilerek kriyotüpler içerisine 1ml hacimde alınmıştır. Hazırlanan kriyotüpler hücrelerin dondurma işlemlerinden zarar görmemeleri adına aşamalı bir şekilde  $-20^{\circ}\text{C}$  ve sonrasında  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş olup daha sonrasında uzun süreli saklanabilmeleri için  $-196^{\circ}\text{C}$ 'deki azot tankına alınmıştır.

### **3.2.2. Uygulanacak İlaç Dozlarının Hazırlanması**

Projemiz kapsamında kullanılacak olan 5-Fluorourasil ve sisplatin kemoterapötik ajanları ile doksisisiklin antibiyotiği satın alınmış olup her biri 0,1M konsantrasyonda ana stok olacak şekilde DMSO ile sulandırılmıştır. Hazırlanan 0,1M'lık ana stok solüsyonlar besi ortamı ile dilüe edilerek hücrelere uygulanacak olan 5, 10, 25, 50 ve  $100\mu\text{M}$ 'lık dozlar elde edilmiştir.

### **3.2.3. Hücre Sayımı ve İlaç Dozlarının Uygulanması**

Kendi besi ortamlarında devamlılığı sağlanan OSC-19 ve MRC-5 hücre hatları ilaç uygulamaları ve sitotoksosite işlemleri öncesinde sayılarak takip edilmiştir. Sayım işlemleri için besiyeri uzaklaştırılan hücreler tripsinizasyon ile flasklardan kaldırılmış ve 15ml'lik falkonlara alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra falkon dibinde oluşan pellet halindeki hücreler 1ml taze besiyeri ile homojenize edilmiştir. Bu aşamada hücrelerin sayımı için 1ml'lik hücre çözeltilisinden 10 $\mu\text{l}$  alınarak 1:1 oranında Trypan Blue solüsyonu ile homojenize edilmiş ve otomatik hücre sayım cihazında sayımları gerçekleştirilmiştir.

Yeterli oranda canlı hücre miktarına ulaşıldığında, hücreler her bir kuyucukta  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 3 tekrarlı olarak 96'lık platelere ekilmiş ve plateler, hücrelerin kuyulara yapışması için  $37^{\circ}\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  koşulları altında 1 gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün hücreler 5, 10, 25, 50 ve  $100\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında 5-Fluorourasil, sisplatin ve doksisisiklin ilaçları ile farklı kombinasyonlarda muamele edilmişlerdir. Uygulanacak olan ilaç kombinasyonları Tablo 3.1'de yer almaktadır. Kontrol olarak değerlendirilecek kuyucuklara aynı miktarda sadece besi ortamı eklenmiştir. Farklı kombinasyonlarda uygulanan bu ilaçların OSC-19 ve MRC-5 hücrelerinin canlılıkları üzerindeki etkinlikleri 3 gün boyunca (24., 48. ve 72. saatlerde ölçülerek) WST-1 yöntemi ile belirlenmiştir.

**Tablo 3.1. Uygulanacak olan ilaç kombinasyonları**

İLAÇ	DOZ (µM)					ZAMAN (SAAT)		
DOKSİSİKLİN	5	10	25	50	100	24	48	72
ŞİSPLATİN	5	10	25	50	100	24	48	72
5- FU	5	10	25	50	100	24	48	72
DOKSİSİKLİN + ŞİSPLATİN	5	10	25	50	100	24	48	72
DOKSİSİKLİN + 5- FU	5	10	25	50	100	24	48	72

### 3.2.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi

Hücre canlılığının ölçümü için kullanılan WST-1 Hücre Proliferasyon Testi canlı hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesini temel almaktadır. Her bir inkübasyon periyodunun sonunda kuyucuklara 10µl WST-1 solüsyonu eklenmiş olup 37°C’de 4 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Bir tetrazolyum tuzu olan WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt] kuyucuklara eklenmesiyle birlikte kuyularda bulunan canlı hücrelerin mitokondrilerinde yer alan dehidrogenazların aktivitesiyle sarı renkli formazan kristallerine dönüşür. Oluşan kristallerin absorbans yoğunluğu canlı hücre yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Hücre canlılığının azalmasına bağlı olarak mitokondriyal aktivite de azalacağından formazan kristallerinin oluşumu azalır. Absorbans değerlerinin spektrofotometrede 440nm dalga boyunda ölçülmesi ile bu farklılıklar tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her iki hücre hattı için de optimum doz ve zaman seçilmiştir.

### 3.2.5. Annexin V-FITC Yöntemi ile Apoptoz-Nekroz Tayini

Sitotoksisite testi doğrultusunda uygulanacak optimum doz ve sürelerin belirlenmesinin ardından, uygulanacak olan ilaçların hücrelerdeki apoptotik ve nekrotik etkilerinin değerlendirilmesi için Akım Sitometri Annexin V Apoptoz-Nekroz analizi yapılmıştır.

Annexin V yöntemi Floresan İzotiyosiyanat (FITC) ve Propidyum İyodür (PI) floresan boyaalarının kullanıldığı bir apoptoz/nekroz tayin yöntemidir. Temel olarak, normal durumda hücre membranının iç yüzeyinde yerleşik olarak bulunan fosfatidil serinin hücrelerde apoptotik ölümün stimülasyonu ile birlikte hücre dışına transloke

olmasına dayanmaktadır. Bu analiz yönteminde FITC ile konjuge halde Annexin V lektini kullanılmaktadır. Annexin V molekülü, apoptotik sürecin başladığı hücrelerde hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidil serinlere bağlanır. Annexin V ile konjuge halde bulunan FITC ise bu bağlanma ile floresan ışımaya meydana getirir. Bu boya ile birlikte kullanılan bir diğer floresan boya olan PI ise nekroza uğramış olan hücrelerin DNA'larına bağlanarak ışımaya verir. Bu ışımalar akım sitometride farklı dedektörler tarafından algılanır. Bu ışımaların şiddetine göre hücreler canlı, apoptotik, nekrotik ve geç apoptotik hücreler olarak sınıflandırılan diyagrama yerleştirilir.

Bu işlemler için her iki hücre hattı da tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak her bir kuyucukta  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6'lı well-platelere ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması için WST-1 yöntemi ile seçilen dozlarda ilaç uygulaması yapılmıştır ve 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonra hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant uzaklaştırılmış dipte kalan pellet üzerine 200 µl medyum eklenerek hücre pelleti homojenize edilmiştir. Bu işlemi takiben, hücre karışımından 100 µl yeni 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiş ve 100 µl Annexin-V- Cell Death Reagent eklenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örneklerin her biri akım sitometri cihazında ölçülmüştür.

Işıma değerlerine göre;

- Annexin V(-), PI(-) hücreler; canlı
- Annexin V(+), PI(-) hücreler; apoptotik
- Annexin (-), PI(+) hücreler; nekrotik
- Annexin(+), PI(+) hücreler; geç apoptotik olarak sınıflandırılmış ve diyagrama yerleştirilen her bir bölgedeki hücre miktarı total hücre miktarına oranlanarak yüzdelik değerler elde edilmiştir.

### **3.2.6. Elde Edilen Sonuçların İstatistiksel Analizi**

DeneySEL çalışmalar 3 tekrarlı şekilde yapılmış olup sonuçların istatistiksel analizleri GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, California) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.  $p < 0,05$  olan ifadeler bilimsel olarak anlamlı farklılıklar olarak not edilmiştir.

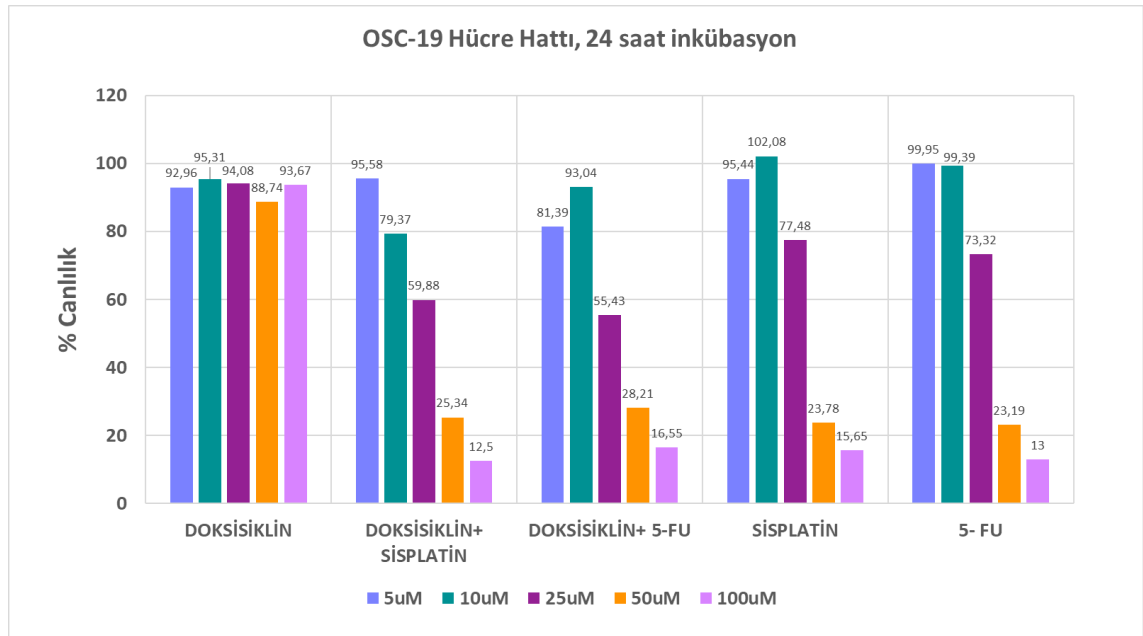
## 4. BULGULAR

### 4.1. WST-1 Bulguları

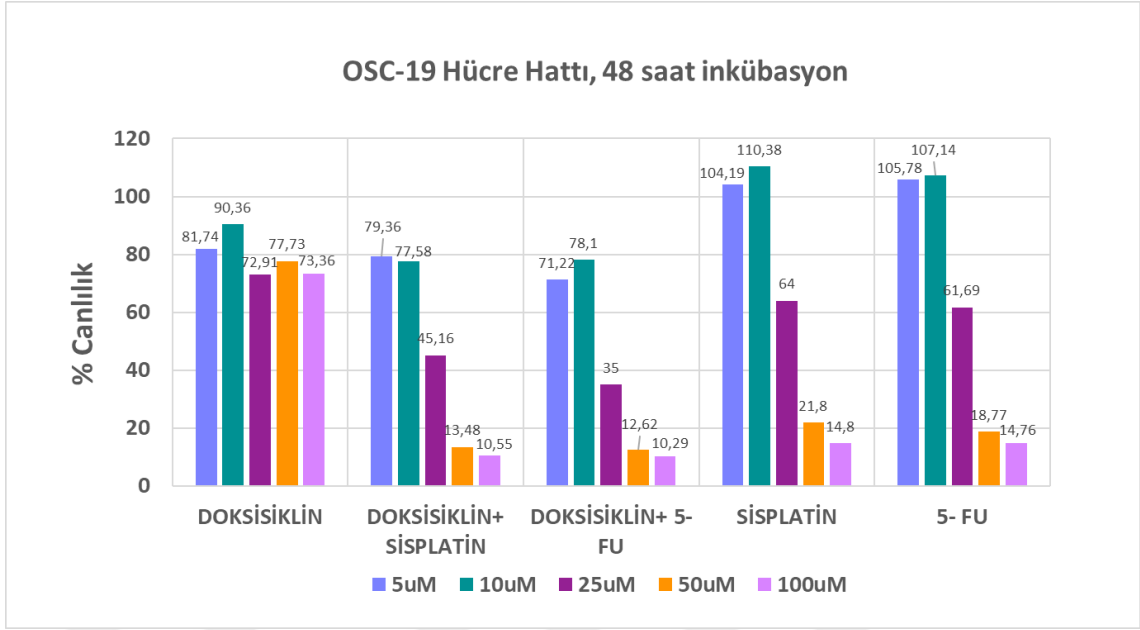
OSC-19 ve MRC-5 hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda 5-Fluorourasil ve sisplatin kemoterapi ajanları ile doksisisiklin antibiyotiği bireysel ve kombine olarak uygulanmıştır. Çalışmamız kapsamında seçtiğimiz kemoterapötik ajanlar ile doksisisiklin antibiyotiğinin OSC-19 ve MRC-5 hücre hatları üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği WST-1 bulguları aşağıdaki gibidir.

#### 4.1.1. İlaç Uygulamalarının OSC-19 Hücre Hattı Üzerinde Canlılığa Etkisi

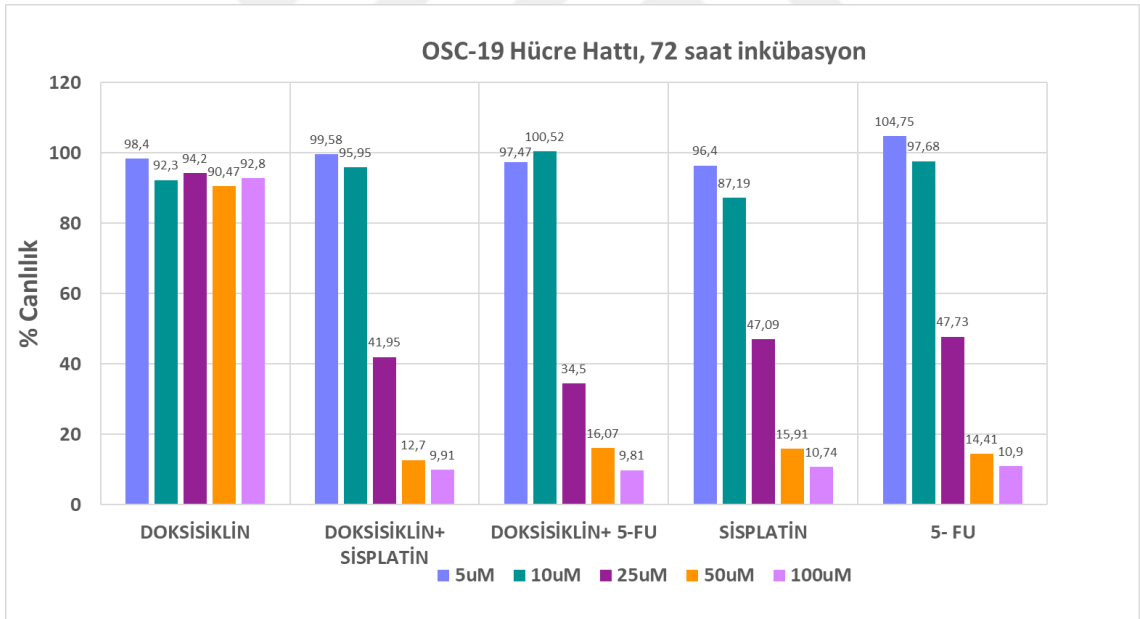
Her bir ilaç hem bireysel hem de doksisisiklin antibiyotiği kombine halde artan dozlarda hazırlanmış ve hücreler ile 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. OSC-19 hücre hattı için, ilaçların 24, 48 ve 72 saat boyunca bireysel ve kombine olarak uygulanmasının hücre canlılığı üzerindeki sonuçları sırasıyla Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te yer almaktadır.



Şekil 4.1 OSC-19 hücre hattı 24 saatlik inkübasyon sonuçları



**Şekil 4.2 OSC-19 hücre hattı 48 saatlik inkübasyon sonuçları**

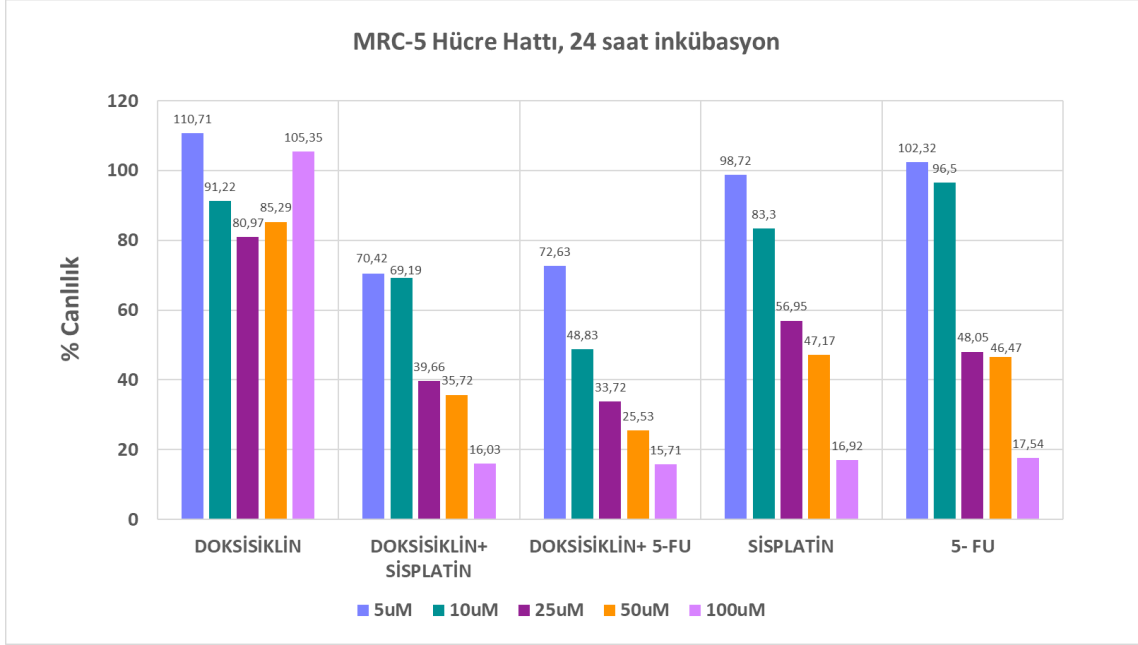


**Şekil 4.3 OSC-19 hücre hattı 72 saatlik inkübasyon sonuçları**

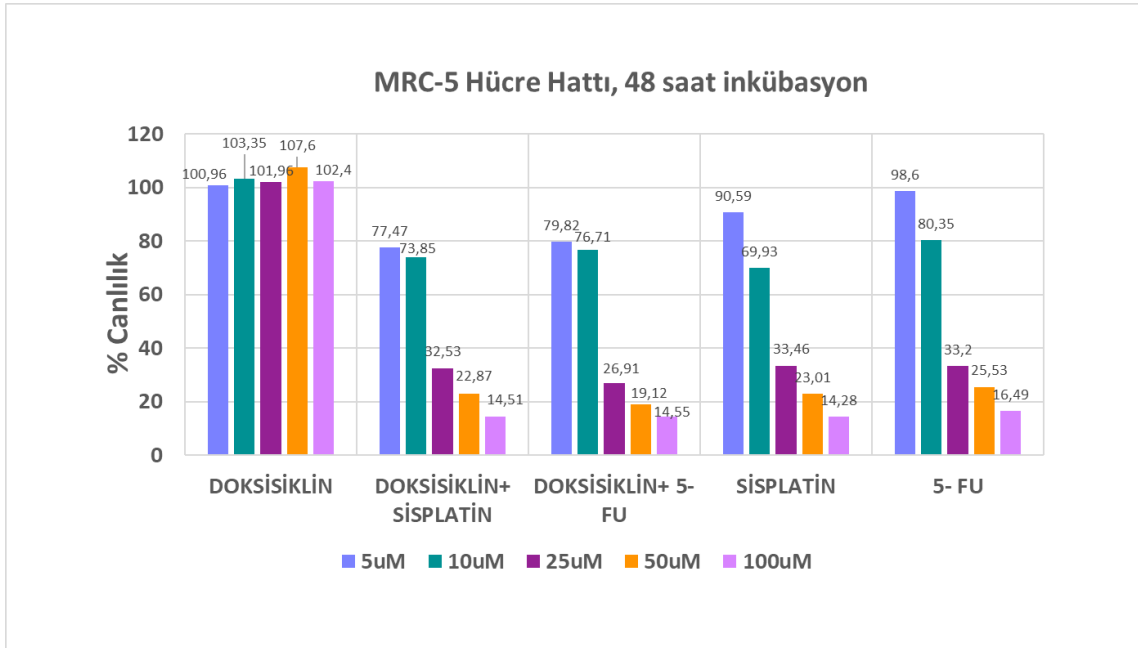
Tekli ilaç uygulamalarına göre; Sisplatin ve 5- Fluorourasil ilaçlarının her ikisi de 25µM itibari ile inkübasyon süresi arttıkça hücre canlılığı üzerinde sitotoksik etkileri artmıştır. Tek başına doksisisiklin uygulamasının ise hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.

#### 4.1.2. İlaç Uygulamalarının MRC-5 Hücre Hattı Üzerindeki Canlılığa Etkisi

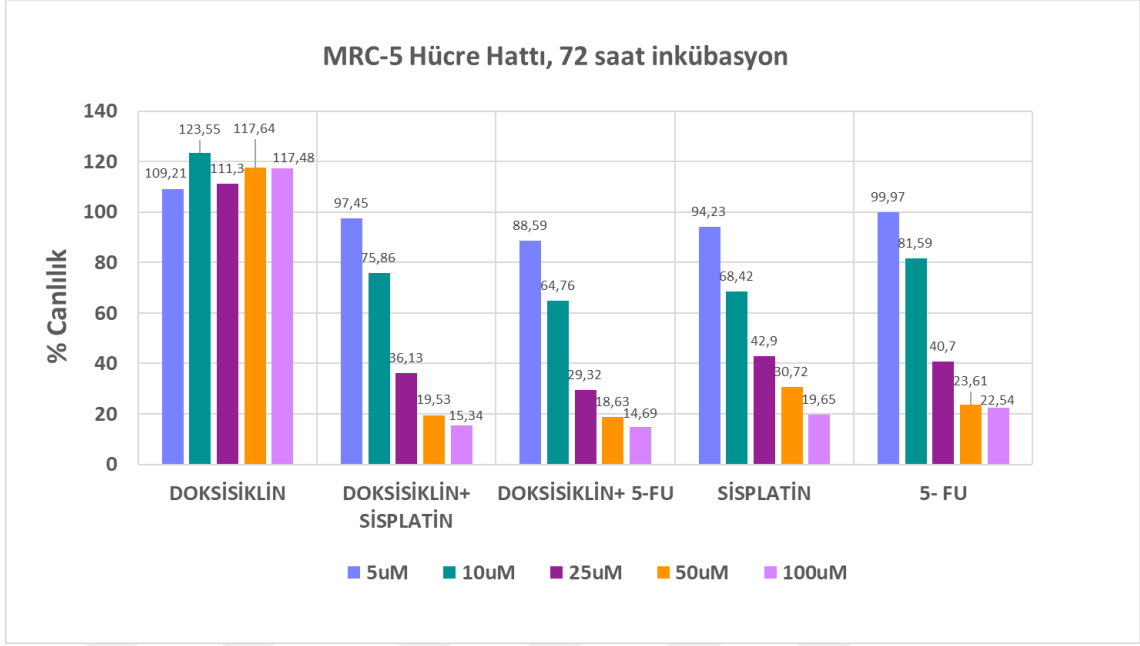
MRC-5 hücre hattının bireysel ve kombine haldeki ilaçlarla artan doz ve süreler boyunca muamele edilmesinin ardından 24., 48. ve 72. saatlerdeki WST-1 ölçümleri sonucuna göre hücre canlılık oranları sırasıyla Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.4 MRC-5 hücre hattı 24 saatlik inkübasyon sonuçları



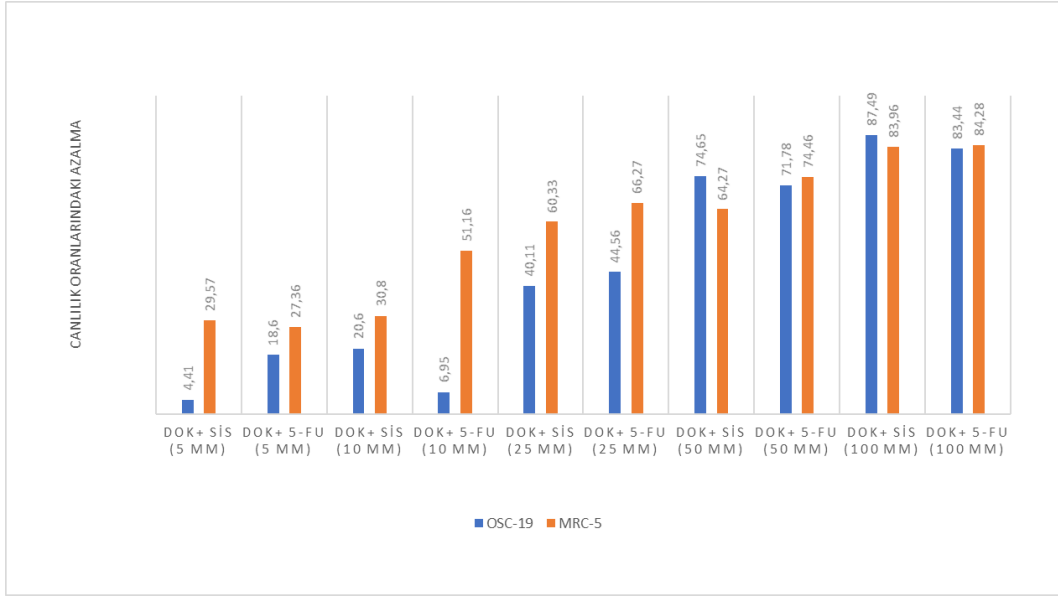
Şekil 4.5 MRC-5 hücre hattı 48 saatlik inkübasyon sonuçları



**Şekil 4.6 MRC-5 hücre hattı 72 saatlik inkübasyon sonuçları**

Bu sonuçlara göre; MRC-5 hücre hattı için doksisisiklinin hücre canlılığı üzerinde anlamlı sitotoksik etkisi gözlenmemekle birlikte kemoterapötik ajanların hem bireysel hem de doksisisiklin ile kombine şekilde uygulanmaları sonucu hücre yoğunluğu artan doz konsantrasyonu ile korele bir şekilde azalmıştır. Doksisisiklinin sağlıklı hücreler üzerinde kemoterapötik ajanların toksik etkilerini azalttığına yönelik bir bulgu edinilememiştir.

Ayrıca, inkübasyon sürelerinin artması ile ilaçların sağlıklı hücre hattı üzerindeki toksik etkinliği istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Bu nedenle, her bir dozdan doksisisiklin- sisplatin ve doksisisiklin- 5-FU şeklinde hazırlanan ilaç kombinasyonlarının, sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi de dikkate alınarak, optimum sitotoksik etkinlikleri 24 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. İlaç kombinasyonlarının sitotoksik aktivitelerine bağlı olarak hem OSC-19 hem de MRC-5 hücre hatlarının hücre canlılığındaki azalma miktarları Şekil 4.7’de yer almaktadır.



**Şekil 4.7 OSC-19 ve MRC-5 hücre hatlarının artan dozlarda Doksisisiklin+ Sisplatin ve Doksisisiklin+ 5-Fluorourasil ilaç kombinasyonları ile 24 saatlik inkübasyonu sonucunda hücre canlılığındaki azalma miktarları (DOK; doksisisiklin, SİS; sisplatin, 5-FU: 5- Fluorourasil)**

Bununla birlikte, OSC-19 hücre hattı için kombine ilaç uygulamalarının (doksisisiklin+ sisplatin ve doksisisiklin+ 5-fluorourasil) 24 saatlik inkübasyon periyodu sonucunda ilaçların bireysel uygulamalarına göre daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdikleri gözlenmiştir. Bu bulgu, oral kanser hücre hattı OSC-19 özelinde, doksisisiklin ile kombine ilaç kullanımının kanser hücrelerinin proliferasyonunu daha etkin bir biçimde baskılaması açısından önemlidir.

24 saatlik inkübasyon sonucunda, OSC-19 hücre hattının 25 $\mu$ M Sisplatin ile muamelesi sonucunda canlılık oranı %77,48 olarak ölçülürken 25 $\mu$ M Doksisisiklin+ 25 $\mu$ M Sisplatin kombinasyonunda hücre canlılığı %59,89'a düşmüştür.

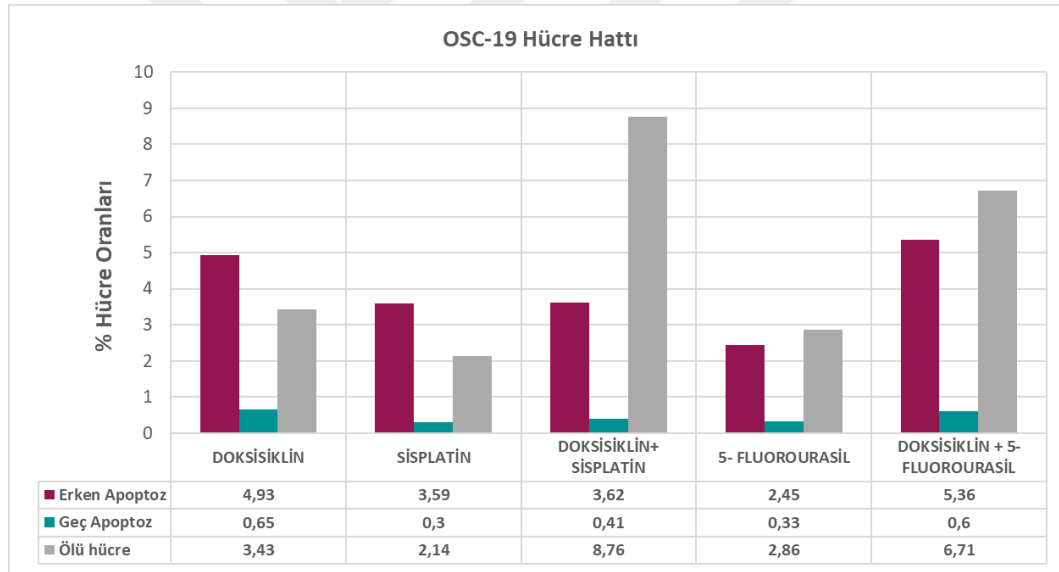
Benzer şekilde, yalnızca 25  $\mu$ M 5-Fluorourasil ile muamele edilen hücrelerdeki canlılık oranı %73,32 iken; 25  $\mu$ M Doksisisiklin+ 25  $\mu$ M 5-Fluorourasil kombinasyonunda bu oran %55,43 olarak kaydedilmiştir. Bu durumda kemoterapötik ajanların bireysel uygulanmasına karşılık, doksisisiklin antibiyotiği ile kombine halde uygulaması sonucunda ilaçların sinerjik olarak daha etkin sitotoksik aktivite göstermeleri dolayısıyla hücre proliferasyonundaki baskılanmanın daha yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Buna karşılık, 24 saatlik inkübasyon periyodunda ilaç konsantrasyonlarının artışı (50 ve 100  $\mu$ M dozlar) ile 25  $\mu$ M ve alt dozlarda gözlenen doksisisiklin antibiyotiği ve

kemoterapötik ajanlar arasındaki sinerjistik etki ortadan kalkmış, ilaçlar arasında antagonistik etki gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre her iki kombinasyon için de uygun doz 25 $\mu$ M olarak belirlenmiştir.

#### 4.2. Flow Sitometri Yöntemi ile Apoptoz/Nekroz Tayini

WST-1 proliferasyon testi ile hücreler üzerindeki optimum sitotoksik etkinlik baz alınarak doz ve inkübasyon süreleri belirlenmiş olup; daha sonrasında bireysel ve kombine haldeki ilaçların, hücre proliferasyonu üzerindeki inhibe edici etkisini apoptotik yol üzerinden gösterip göstermediğini araştırmak için Annexin V-FITC/PI ikili boyama yöntemi kullanılmıştır. Bunun için her bir ilaç ve kombine ilaçlar 25 $\mu$ M doz halinde hazırlanarak 6'lı well-platelere ekilen hücrelere uygulanmış, 24 saatlik inkübe edilmiş ve flow sitometride ölçümleri yapılmıştır. Apoptoz analizi sonuçları Şekil 4.8'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.8 OSC-19 hücre hattında bireysel ve kombine halde uygulanan ilaçların apoptoz analiz sonuçları**

Yalnız siplatin ile muamele edilmiş örneklerde erken apoptotik hücre ölümü %3,59 iken doksisisiklin ile kombine uygulamada erken apoptotik hücre miktarı %3,62 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, doksisisiklinin siplatin ile kombinasyonunun apoptotik ölümü uyarmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Ancak ilaç uygulamaları sonrası ölü hücre miktarları %2,14'ten %8,76'ya yükselmiştir.

5-Fluorourasil uygulamasında ise bireysel ilaç muamelesi sonucunda erken apoptotik hücreler %2,45 olarak ölçülürken doksisiklin ile kombine olarak yapılan ilaç uygulamasında %5,36 oranında apoptotik hücre ölümü gözlenmiştir. Doksisiklin+ 5-Fluorourasil kombinasyonunun hücrel apoptozu uyarmada istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturduğu söylenebilir.



## 5. TARTIŞMA

Gelişen teknolojiye rağmen hayatta kalma oranlarında son yirmi yılda önemli bir değişiklik olmaması, tedaviye bağlı komplikasyonların hâla oldukça yoğun olması ve yaşam kalitesinin büyük ölçüde düşmesi nedeniyle araştırmacılar oral kanserlerin tanı ve tedavisiyle yoğun biçimde ilgilenmektedir. Özellikle ileri evre kanserlerde hastalara uygulanan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonlarının yanı sıra son yıllarda hedefe yönelik kemoterapi, immunoterapi, ve antibiyotikler üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında, doksisiklinin olası antineoplastik özelliğini araştırmak amacıyla skuamöz karakterli dil kanseri hücre hattına sisplatin ve 5-FU kemoterapötik ajanları ile ayrı ayrı ve kombine olarak uygulanmıştır.

İlaçların yeniden konumlandırılması, orijinal tıbbi endikasyonun kapsamı dışında kalan onaylanmış veya araştırma aşamasındaki ilaçların, farklı alanlarda kullanımlarını test etmeye yönelik bir stratejidir. Bu strateji, belirli bir endikasyon için tamamen yeni bir ilaç geliştirmeye kıyasla çeşitli avantajlar sunar. Birincisi ve belki de en önemlisi, yeniden konumlandırılacak ilacın, prelinik modellerde ve insanlarda yeterince güvenli olduğu tespit edildiğinden, etkinliğine dair yapılacak deneylerde güvenlik açısından risk en aza indirgenmiş olur. İkincisi, ilacın geliştirilmesi için harcanacak zaman kısaltılabilir, çünkü klinik öncesi testlerin çoğu, güvenlik değerlendirmesi ve bazı durumlarda formülasyon geliştirme gereği zaten tamamlanmış olacaktır. Üçüncüsü, daha az yatırıma ihtiyaç duyulmaktadır, ancak bu büyük ölçüde yeniden konumlandırılacak ilacın gelişim aşamasına ve sürecine bağlı olarak değişecektir. Bu bilgiler ışığında antibiyotikler, mitokondriyal biyogenez ve matriks metaloproteinaz inhibisyonu, lenfogenezde sinyal yollarını etkileme mekanizmaları ile antineoplastik potansiyele sahip olduğunu düşündürmüş, bundan dolayı da araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Tek başlarına kullanımı ve kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımları sonucu umut veren sonuçlar raporlanmıştır.

Kemoterapi, kanseri tedavi etmek, kanserin yayılımını önlemek, tümörün büyümesini yavaşlatmak ve metastaz yapmış kanser hücrelerini yok etmek amacıyla uygulanan ilaç tedavisidir. En çok kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan sisplatinin de oral kanserler dahil olmak üzere birçok kanser türünde etkili olduğu uzun zamandır bilinmektedir (Szturz ve ark., 2017; Feng ve ark., 2019). Son dönemde

yapılmış çalışmalar da sisplatinin, özellikle arteriyel uygulamalardan sonra tümör bölgesine daha yoğun konsantrasyonda ulaştığını ve böylece kemoterapötik etkinliğini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir (Heukelom ve ark., 2015; Ye ve ark., 2016).

Chen ve ark. oral epidermal hücre kültürü üzerine yapılan bir çalışmada sisplatinin ve kordisepinin sitotoksik etkilerini ayrı ayrı ve kombine kullanarak değerlendirmiştir. 24 saat sonunda sisplatinin meydana getirdiği sitotoksik etki, çalışmamızla oldukça benzer sonuçlar vermiştir (Chen ve ark., 2013). Bunun yanı sıra çalışmamızda sisplatin, doksisisiklin ile kombine uygulandığında sitotoksik etki daha da artmış ve literatürde antibiyotik ve kemoterapötik ajanların oral kanser hücre hattında kombine kullanıldığı ilk çalışma olmuştur.

Oral kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir diğer kemoterapötik ajan 5-FU'nun sitotoksik etkileri de uzun zamandır bilinmektedir (Vodenkova ve ark., 2020). Tong ve ark., 5-FU'nun tek başına diğer kanserlerdeki aktivitelerine bağlı olarak oral kanser hücrelerinde apoptozu artırabileceğini öngörmüştür ve buna dayanarak 5-FU'yu dört farklı oral kanser hücre dizisine uygulayarak sonuçları gözlemlemiştir. Sonuçlar 5-FU'nun apoptozu indüklediğini ve oral kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisini kanıtladığını göstermiştir (Tong ve ark, 1999). Bir başka çalışmada Tamatani ve ark. oral kanser hücre kültürüne çalışmamızla aynı derişimde 5-FU uygulamıştır ve 24 saat sonunda elde ettiği sitotoksik etki yine çalışmamızla benzer sonuçlar vermiştir (Tamatani ve ark., 2012).

Apoptoz, hasarlanan ve onarılması olanaksız hale gelen hücrelerin, en az iltihabi reaksiyonla ortadan kaldırılmasıdır. Kanserli hücrelerin ortadan kaldırılması ve tümör oluşumunun engellenmesi için bu programlanmış hücre ölümünün meydana gelmesi istenir. Bununla birlikte, apoptozu arttırmak için tasarlanmış yeni ilaçların veya tedavi stratejilerinin kullanımıyla ilgili pek çok soru ortaya çıkmaktadır. Bu ilaçların veya tedavi stratejilerinin insanlarda güvenli bir şekilde kullanılmadan önce kritik testlerden geçmesi gerekmektedir (Wong, 2011). Yadav ve ark., moksifloksasin ve siprofloksasinin pankreas kanseri hücre dizilerinde apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunduğunu göstermiştir. Ek olarak aynı zamanda moksifloksasin ve siprofloksasinin sisplatin kaynaklı apoptozu artırdığını da bildirmiştir. Araştırmacılar, moksifloksasin ve siprofloksasinin pankreas kanseri tedavisinde potansiyel neo-adjüvan kemoterapötik ajanlar olarak kullanılabilirliğini belirtmiştir (Yadav ve ark., 2015). Bu çalışmada da

doksisiklin sisplatin ile kombine olarak oral kanser hücre hattına uygulandığında apoptozu artırmış hatta 5-FU ile birlikte uygulandığında apoptozu anlamlı biçimde artırmıştır ( $p<0.05$ ).

Mukai ve arkadaşları, pankreas kanseri hücre hattında bir epidermal büyüme faktörü olan gefitinibi, klaritromisin ve azitromisin ile birlikte uyguladıklarında gefitinibin tek başına yaptığı sitotoksik etkiyi artırdığını gözlemlemişlerdir. Bu bulgulara ek olarak da makrolidler, gefitinib ile indüklenen sitotoksiteyi artırarak otofaji akışının blokajına katkı sağlamışlardır. Araştırmacılar çalışmada elde ettikleri sitotoksik etkilerin apoptoz ile değil, nekrotik yolla olduğunu belirtmişlerdir. Gelecekteki çalışmalarda makrolid antibiyotiklerinin büyüme faktörlerinin engellendiği kemoterapötik tedavilerde kemosensitizer olarak kullanılmasını önermişlerdir (Mukai ve ark., 2016).

Hirasawa ve arkadaşları, Muaki ve arkadaşlarının çalışmasının ardılı olarak baş-boyun kanseri hücre hatlarında azitromisin ve klaritromisinin amino asitten yoksun kültür koşullarındaki sitotoksik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada, antibiyotiklerin amino asitten yoksun ortamda CHOP'un (siklofosamid, doksorobusin, vinkristin, prednizon) etkilerini indükleyerek baş-boyun kanseri hücrelerinde otofajiyi artırdığını gözlemlenmiştir; ancak tam kültür ortamında herhangi bir etkide bulunmadıkları raporlanmıştır. Yine de bu çalışmalar sonucunda araştırmacılar, makrolidlerin kemoterapötik ajanları destekleyici etkileriyle tümör tedavilerinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Hirasawa ve ark., 2016).

İki farklı çalışmada, levofloksasin antibiyotiğinin farklı kanser türlerinde apoptoz üzerine etkisi araştırılmıştır. Yu ve ark., levofloksasinin meme kanseri hücre kültüründeki etkinliğini araştırmıştır ve kanserli hücrelerde apoptozu indüklediğini raporlamıştır. Aynı çalışmada, in vivo olarak farelere levofloksosin ve 5-FU kombine olarak uygulandığında ise ilaçların birbirini sinerjik olarak etkilediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmanın bir sonucu olarak, araştırmacılar, meme kanserinde levofloksasinin aktivitesinin, mitokondriyal biyogenezi bastırma kabiliyetine ve meme kanseri tedavisi için potansiyel bir strateji olarak PI3K / Akt / mTOR ve MAPK / ERK yollarındaki rollerine bağlı olduğunu vurgulamaktadır (Yu ve ark., 2016). Çalışmamızda da bu bulguları destekler nitelikte tek başına doksisiklin, oral kanser hücre hattına

uygulandığında apoptozu artırmıştır, 5-FU ile kombine uygulandığında ise apoptotik etki anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.05$ ).

Bir diğer çalışmada Song ve arkadaşları levofloksasinin in vitro ve in vivo akciğer kanseri hücrelerine karşı etkili olduğunu, etki mekanizmalarının mitokondriyal kompleks aktivitelerinin baskılanmasını, mitokondriyal solunumun ve ATP üretiminin inhibisyonunu ayrıca oksidatif hasarın indüksiyonunu içerdiğini raporlamışlardır. Bu nedenle araştırmacılar akciğer kanseri tedavisinde levofloksasinin yeniden konumlandırılmasını önermektedir (Song ve ark., 2016). Lamb ve arkadaşlarının çalışmasında da sekiz farklı kanser hücre hattına, doksisisiklini de içeren beş farklı mitokondri- hedefleyici antibiyotik kullanmıştır; Song ve arkadaşlarının çalışmasına benzer mitokondriyal kompleks aktivitesi gözlenmiş, tümör hücrelerinin büyümesinin azaldığı raporlanmıştır (Lamb ve ark, 2015a). Bu çalışmalar, çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde doksisisiklinin antineoplastik etkiye sahip olduğu söylenebilir; farklı kemoterapötik ajanlarla kombine edildiğinde meydana gelebilecek daha güçlü etki olasılıkların ileri çalışmalarla değerlendirilmesi anlamlı olacaktır.

Lamb ve arkadaşları çalışmalarında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi onaylı bazı antibiyotiklerin mitokondri hedefleyici özelliklerini kullanıp antineoplastik etki gösterebileceğini gözlemledikten sonra bir çalışma daha yapmıştır. Bu çalışmalarında doksisisiklini iki farklı meme kanseri hücresine uygulamış, mamosfer formasyonunun inhibe edildiği, DNA tamir mekanizmasında etkinliği olan DNA-PK proteinin %90'dan fazla azaldığı gözlenmiştir (Lamb ve ark., 2015b).

Pulvino ve arkadaşları çalışmalarında doksisisiklinin antineoplastik potansiyelinden hareketle diffüz büyük B hücreli lenfoma üzerindeki etkilerini araştırmıştır. İn vivo ve in vitro olarak değerlendirilen çalışmada doksisisiklin, CSN5 aktivitesini kısmen engelleyip HSP90 seviyesini ve fonksiyonunu azaltarak diffüz büyük B hücreli lenfomanın büyümesini inhibe etmiştir. Çalışmalarının sonunda ise doksisisiklinin diffüz B hücreli lenfoma üzerindeki sitotoksik etkilerini kemoterapiye dirençli kanser kök hücrelerini hedefleyerek gerçekleştirmiş olabileceğini de raporlamışlardır (Pulvino ve ark., 2015). Ancak Brown ve Jackson, kanser kök hücrelerinin tedavisinin ancak DNA hasarı ile mümkün olacağını belirtmişlerdir. İnsan hücrelerindeki dilasyonun inhibisyonunun, hücreleri radyoterapiye ve kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirdiğini raporlamış, ancak bu sinerjinin arkasındaki

mekanizmaların tam olarak anlaşılmadığını ve tutarsız olduğunu belirtmişlerdir (Brown ve Jackson, 2015). Yine de, iki çalışmada da DNA hasarı tepkisinin, protein stabilitesini ve fonksiyonunu düzenleyen, de novo protein sentezini önleyen, ubiquitinasyon ve nedilasyon gibi tersine çevrilebilir post-translasyonel modifikasyonları içeren sıkı düzenlenmiş bir süreç olduğu vurgulanmıştır.

Shen ve arkadaşları oral skuamöz hücreli karsinomların kötü prognozunun diğer organlara ya da lenf düğümlerine metastazından kaynaklandığını belirtmişler, bu nedenle MMPLerin inhibasyonunu sağlayan ajanların tedavide kullanılabileceğini düşünmüşlerdir. Bu düşüncelerinden hareketle doksisisiklini baş-boyun kanseri hücre hattına ve ksenograft uygulanmış fareler üzerine uygulayarak MMP ekspresyonundaki üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Yüksek pro-MMP-2 ve pro-MMP-9 ihtiva eden farklı kültür koşullarındaki oral skuamöz karsinom hücrelerine doza bağımlı olarak doksisisiklin uygulanmış ve 24 saat sonunda MMP miktarları azalmıştır. Ek olarak kanserli hücrelerin invazyonunu ve migrasyon aktivitelerini de önemli ölçüde baskılamıştır. Aynı çalışmada doksisisiklin farelere uygulandığında ise %85,6'lık bir inhibasyon ile tümör büyümesini kısıtladığı gözlenmiştir. Sonuç olarak MMP-9 ekspresyonu transkripsiyonel seviyede, MMP-2 ekspresyonu da post-transkripsiyonel seviyede azalmıştır ve araştırmacılar tarafından doksisisiklinin bu etkileriyle OSHK'lar üzerinde adjuvan bir terapötik etkiye sahip olabileceği iddia edilmiştir (Shen ve ark., 2010).

Song ve arkadaşları, tetrasiklinlerin farklı kanser hücrelerinde matriks metalloproteinaz inhibasyonu ve apoptoz yapmasından yola çıkarak analogları olan doksisisiklin, minoksiklin ve kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklin antibiyotiklerini insan akut miyeloid lösemi hücre hattına uygulamıştır. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda üç farklı ilacın da lösemi hücrelerindeki hücre ölümünü ve apoptozu indüklediğini raporlamışlardır. Ayrıca araştırmacıların doksisisiklini uygulama dozu ve süresi çalışmamızla birebir aynı olup, meydana getirdiği sitotoksik etki ve apoptoz verileri de oldukça benzerdir (Song ve ark, 2014).

Wang ve arkadaşları çalışmalarında doksisisiklinin fokal adezyon kinaz sinyal yolu üzerinden MMP-2 ve MMP-9'un lösemik hücre ekspresyonunu inhibe ederek lösemili hücrelerin göçünü engellemeyi/ azaltmayı amaçlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda akut ve kronik myeloid lösemi hücrelerine doksisisiklin uygulayan

araştırmacılar, çalışmanın sonucunda doksisisiklinin, lösemik hücrelerin göçünü kısmen de olsa engellediğini bildirmişlerdir. Fokal adezyon kinazın aşağı regülasyonuna ve fosforilasyonuna ek olarak, alt akım jelatinazlarının inhibisyonunun, doksisisiklin aracılı göç inhibisyonunda rol oynadığı öne sürülmüştür. Bu nedenle de doksisisiklinin fokal adezyon kinaz sinyal yolunu inhibe ederek lösemik hücrelerin göçünü zayıflatma potansiyeli olduğunu iddia etmişlerdir (Wang ve ark., 2015).

Doksisisiklinin sitotoksik bir etkiye sahip olduğu fark edildiğinde başta lösemi olmak üzere meme kanseri, prostat kanseri gibi birçok kanserli hücre dizisinde hücre ölümlünü indüklediği ortaya çıkmıştır (Zhang ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2017; Gavriatopoulou ve ark., 2018). Sitotoksik ilaçlar ile hücre ölümlü ve apoptoz aktivasyonu kanser hücrelerini ortadan kaldırmaktadır. Son araştırmalar, PI3K inhibitörlerinin, dönüştürölmüş hücre letalitesinde önemli bir rol oynayan Mcl-1'i etkili bir şekilde aşağı regüle ettiğini göstermektedir. Bazı PI3K / mTOR inhibitörlerinin lösemik hücre hatlarında hücre ölümlüne aracılık edebileceği raporlanmıştır. Tetrasiklinlerin de PI3K / AKT / mTOR inhibisyonu üzerine öldürücölüğü keskin bir şekilde artıran Bcl-2 ve Bcl-xL'in bastırılmasını indüklediği belirtilmiştir (Ali ve ark., 2017).

Doksisisiklinin etkinliği uzun zamandır bilinmektedir, tolerasyonu ve ulaşımı kolaydır, birçok enfeksiyona karşı kullanılmaktadır. Çalışmamızda da kanserli hücre hattına uygulandığında sitotoksik etki oluşturmuş, sağlıklı hücreye uygulandığında ise sağlıklı hücrelerde proliferatif bir etki oluşturmuştur. Bilindiği üzere kemoterapi hastalarının bağışıklık sistemi hasta olmayan bireylere göre düşüktür ve bu hastalar enfeksiyona yatkındır. Doksisisiklin, hücre költüründe gösterdiği güvenli kullanım ile akıllara gelecekte kemoterapi alan hastalara standart uygulamada yer alabilir mi hipotezini getirmektedir. Doksisisiklin ve kemoterapi ajanları birlikte kullanılırsa tümörü daha iyi baskılayabilir mi ya da kemoterapinin süresini kısaltabilir mi? Tümörün olası baskılanması, yapılacak cerrahi operasyonun boyutunu azaltabilir; alınacak radyoterapinin dozunun ya da süresinin azalmasını sağlayabilir ve buna bağlı olarak da kemoradyoterapiye bağlı yan etkiler minimize edilebilir. Özellikle lokal ileri evre tümörlerde lenf bezlerinde tutulum da mevcutsa tedavi prognozu oldukça zayıftır. Bu durumda hastalığın teşhisinin ardından radyoterapi öncesi bu kombinasyonun uygulanması yaşam kalitesinin daha yüksekte tutulmasını sağlayabilir.

Literatürde daha önce yapılmış çalışmalara paralel olan bulgularımıza dayanarak doksisisiklinin kemoterapötik ajanlarla birlikte uygulanmasının gelecekteki çalışmalar için yeni bir bakış açısı ve rehber olabileceğini söyleyebiliriz. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, doksisisiklin ve kemoterapötik ajan kombinasyonlarının, gelecekte apoptoz yolaklarının moleküler mekanizmalarını anlamak için in vivo çalışmalarda kullanılmasını, hatta sadece oral kanserlerde değil, diğer kanser türleri için de ek parametrelerle daha fazla araştırma yapılma potansiyeline sahip olabileceği göz ardı edilmemelidir.



## KAYNAKLAR

1. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A ve Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24):9160.
2. Agra IM, Carvalho AL, Pinto CA, Martins EP, Filho JG, Soares FA ve ark. Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008; 134(7): 743-749.
3. Ali I, Alfarouk KO, Reshkin SJ ve Ibrahim ME. Doxycycline as Potential Anti-cancer Agent. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017; 17(12): 1617-1623.
4. Alrashdan MS, Cirillo N ve McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Arch Dermatol Res*. 2016;308(8):539-551.
5. Alva RC, Koushik ASK, Sweta B, Janaki MG, Ponni TRA, Kumar M ve ark. Brachytherapy for Oral Cavity Cancers in the Era of Intensity-Modulated Radiotherapy: Save it or Shelve it. *Indian J Surg Oncol*. 2020; 11(3): 406-411.
6. American Cancer Society.  
<https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/treating/immunotherapy.html>. Son erişim tarihi 18.06.2021
7. Aoki S, Takezawa T, Sugihara H ve Toda S. Progress in cell culture systems for pathological research. *Pathol Int*. 2016; 66(10): 554-562.
8. Arakeri G ve Brennan PA. Oral submucous fibrosis: an overview of the aetiology, pathogenesis, classification, and principles of management. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 51(7): 587-593.
9. Arakeri G ve Brennan PA. Oral submucous fibrosis: an overview of the aetiology, pathogenesis, classification, and principles of management. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 51(7): 587-593.
10. Ashburn TT ve Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3(8): 673-683.
11. Bartık Keleş D. İnsan Glioblastoma Hücrelerinde Sertralin ve Penfluridol'ün Tümoreneze ve Metastatik Hücre Davranışı Üzerindeki Etkilerin Değerlendirilmesi: İlaç Yeniden Konumlandırma. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Sınır Bilimler ABD. Yüksek Lisans Tezi. İzmir. 2019.

12. Bektas-Kayhan K, Karagöz G, Kesimli MC, Karadeniz N, Meral R, Altun M ve ark. Carcinoma of the Tongue: A Case-control Study on Etiologic Factors and Dental Trauma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(5): 2225-2229.
13. Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, Posner MR, Vermorken JB, Cruz Hernandez JJ ve ark. Meta-Analysis of Chemotherapy in Head and Neck Cancer, Induction Project, Collaborative Group. Taxane- cisplatin- fluorouracil as induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancers: an individual patient data meta-analysis of the meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer group. *J Clin Oncol.* 2013; 31(23): 2854-60.
14. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P ve ark. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366(26): 2455-2465.
15. Bravi F, Bosetti C, Filomeno M, Levi F, Garavello W, Galimberti S ve ark. Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. *Br J Cancer.* 2013; 109(11): 2904-2910.
16. Brown JS ve Jackson SP. Ubiquitylation, neddylation and the DNA damage response. *Open Biol.* 2015; 5(4): 150018.
17. Burra P ve Rodriguez-Castro K. Neoplastic disease after liver transplantation: Focus on de novo neoplasms. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(29): 8753–8768.
18. Candotto V, Lauritano D, Nardone M, Baggi L, Arcuri C, Gatto R ve ark. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol (Rome).* 2017; 10(3): 209-220.
19. Carneiro-Neto JN, de-Menezes JD, Moura LB, Massucato EM, ve de-Andrade CR. Protocols for management of oral complications of chemotherapy and/or radiotherapy for oral cancer: Systematic review and meta-analysis current. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017; 22(1): 15- 23.
20. Carrard VC, Brouns ER, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(3):e411-e413.
21. Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2019; 18: 1533033819867354.

22. Chen YH, Hao LJ, Hung CP, Chen JW, Leu SF, Huang BM. Apoptotic effect of cisplatin and cordycepin on OC3 human oral cancer cells. *Chin J Integr Med.* 2014; 20(8):624-32.
23. Civantos FJ, Karakullukcu B, Biel M, Silver CE, Rinaldo A, Saba NF ve ark. A Review of Photodynamic Therapy for Neoplasms of the Head and Neck. *Adv Ther.* 2018; 35(3): 324-340.
24. Dai W, Li Y, Zhou Q, Xu Z, Sun C, Tan X ve ark. Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med.* 2014; 43(4): 250-7.
25. Dasari S ve Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364-78.
26. Dhar S, Kolishetti N, Lippard SJ ve Farokhzad OC. Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(5) :1850-5.
27. Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habits. *BMJ* 1954; 1: 1451–5.
28. Eisen DP. Doxycycline. İçinde: Grayson ML (editör). *Kucers' The Use of Antibiotics* (7. ed). Florida: CRC Press, 2018; 1204-29.
29. Eljack ND, Ma HY, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ ve ark. Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. *Metallomics.* 2014; 6(11): 2126-33.
30. Epstein J ve Elad S. Oral and Oropharyngeal Cancer. İçinde: Glick M. (ed.), *Burket's Oral Medicine* (12. edisyon). Shelton, Connecticut, 2015; 173-200.
31. Farmer ZL, Kim ES ve Carrizosa DR. Gene Therapy in Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019; 31(1): 117-124.
32. Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, Roshangar L, Khan H, Kouhsoltani M ve ark. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomed Pharmacother.* 2019; 109: 391-401.
33. Feng Y, Yang DS, Tang HB, Ding YS, Li XG. Efficacy and safety of cisplatin for the management of adult patients with oral cancer: A protocol for systematic review. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98(51): e18210.

34. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M ve ark. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019; 144(8): 1941-1953.
35. Ferrara JLM ve Chaudhry MS. GVHD: biology matters. *Blood Adv*. 2018; 2(22): 3411-3417.
36. Figueira JA ve Veltrini VC. Photodynamic therapy in oral potentially malignant disorders-Critical literature review of existing protocols. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017; 20: 125-129.
37. Fury MG, Xiao H, Sherman EJ, Baxi S, Smith-Marrone S, Schupak K ve ark. Phase II trial of bevacizumab + cetuximab + cisplatin with concurrent intensity-modulated radiation therapy for patients with stage III/IVB head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016; 38(1): 566-570.
38. Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C ve La Vecchia C. The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatol*. 2009; 58(1-2): 25-34.
39. Gau M, Karabajakian A, Reverdy T, Neidhardt EM, Fayette J. Induction chemotherapy in head and neck cancers: Results and controversies. *Oral Oncol*. 2019; 95: 164-169.
40. Gavriatopoulou M, Musto P, Caers J, Merlini G, Kastiris E, van de Donk N, Gay F ve ark. European myeloma network recommendations on diagnosis and management of patients with rare plasma cell dyscrasias. *Leukemia*. 2018; 32(9): 1883-1898.
41. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392(10159): 1789-1858.
42. Goerner M, Seiwert TY ve Sudhoff H. Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments-. *Head Neck Oncol*. 2010; 2: 8.
43. Grégoire V, Evans M, Le QT, Bourhis J, Budach V, Chen A ve ark. Delineation of the primary tumour Clinical Target Volumes (CTV-P) in laryngeal, hypopharyngeal, oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma: AIRO, CACA, DAHANCA, EORTC, GEORCC, GORTEC, HKNPCSG, HNCIG, IAG-

- KHT, LPRHHT, NCIC CTG, NCRI, NRG Oncology, PHNS, SBRT, SOMERA, SRO, SSHNO, TROG consensus guidelines. *Radiother Oncol.* 2018;126(1): 3-24.
44. Gröber U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, ve Holick MF. Vitamin D. *Dermatoendocrinol.* 2013; 5(3): 331–347.
45. Harrison C. Coronavirus puts drug repurposing on the fast track. *Nat Biotechnol.* 2020 Apr;38(4):379-381.
46. Hartner L. Chemotherapy for Oral Cancer. *Dent Clin North Am.* 2018;62(1):87-97.
47. Heukelom J, Lopez-Yurda M, Balm AJ, Wijers OB, Buter J, Gregor T ve ark. Late follow-up of the randomized radiation and concomitant high-dose intra-arterial or intravenous cisplatin (RADPLAT) trial for advanced head and neck cancer. *Head Neck.* 2016; 38 Suppl 1: E488-E493.
48. Hirasawa K, Moriya S, Miyahara K, Kazama H, Hirota A, Takemura J ve ark. Macrolide Antibiotics Exhibit Cytotoxic Effect under Amino Acid-Depleted Culture Condition by Blocking Autophagy Flux in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *PLoS One.* 2016;11(12): e0164529.
49. Holmes NE ve Charles PGP. Safety and efficacy review of Doxycycline. *Clin. Med. Insights Ther.*, 2009, 1, 471-482.
50. Hsieh CH, Shueng PW, Wang LY, Huang YC, Liao LJ, Lo WC ve ark. Impact of postoperative daily image-guided intensity-modulated radiotherapy on overall and local progression-free survival in patients with oral cavity cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16: 139.
51. Hsu FT, Chang B, Chiang IT, Wu TH ve Hwang JJ. Synergistic effect of sorafenib with ionizing radiation on human oral cancer cells. *In Vivo.* 2014; 28(5): 925-933.
52. Huang SH ve O’Sullivan B. Oral cancer: current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18: 233- 240.
53. Human Oral Microbiome Database, <http://www.homd.org>. Son erişim tarihi 18.06.2021
54. Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW ve ark. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: a systematic review. *Eur J Cancer* 2017; 82: 115–27.

55. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2007; 89: 1-592.
56. Irani S. Pre-Cancerous Lesions in the Oral and Maxillofacial Region: A Literature Review with Special Focus on Etiopathogenesis. Iran J Pathol. 2016 Fall;11(4):303-322.
57. Ishii I, Harada Y ve Kasahara T. Reprofilin, a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration, Front. Oncol 2012; 2, 137.
58. Jiang S ve Dong Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. Curr Probl Cancer. 2017; 41(5): 323-327
59. Johnson NW ve Amarasinghe H. Global Epidemiology. İçinde Shah JH ve Johnson NW (Ed) Oral and Oropharyngeal Cancer (2. Ed). New York: CRC Press, 2019; 3-18.
60. Johnson NW, Gupta B, Speicher DJ, Ray SC ve Shaikh MH. Etiology and Risk Factors. İçinde Shah JH ve Johnson NW (Ed) Oral and Oropharyngeal Cancer (2. Ed). New York: CRC Press, 2019; 19-95.
61. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer. 2007; 7(8): 573-84.
62. Kerawala C, Roques T, Jeannon JP, Bisase B. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. J Laryngol Otol. 2016; 130(2): 83-89.
63. Kim D ve Li R. Contemporary Treatment of Locally Advanced Oral Cancer. Curr Treat Options Oncol. 2019; 20(4): 32.
64. Lamb R, Fiorillo M, Chadwick A, Ozsvári B, Reeves KJ, Smith DL ve ark. Doxycycline down-regulates DNA-PK and radiosensitizes tumor initiating cells: Implications for more effective radiation therapy. Oncotarget. 2015;6(16):14005-14025.
65. Lamb R, Ozsvári B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martínez-Oschoorn UE ve ark. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. Oncotarget 2015; 6, 4569-4584.

66. Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS ve Schutjens MH. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov Today*. 2015; 20(8): 1027-1034.
67. Li Q, Chuang S, Neto JE, Menezes A, Matos E, Koifman S ve ark. Vitamin or mineral supplement intake and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the inhance consortium. *Int J Cancer*. 2012; 131(7): 1686–1699.
68. Liu L, Chen J, Cai X, Yao Z ve Huang J. Progress in targeted therapeutic drugs for oral squamous cell carcinoma. *Surg Oncol*. 2019: 90-97.
69. Liu Q, Zhang X, Zeng Y. Targeted and personalized therapy for cancer: theory and practice in China. *Sci China Life Sci*. 2011; 54(12) :1081-4.
70. Liu S, Feng I, Wu Y, Chen C, Hsiung C, Chang H ve ark. Implication for second primary cancer from visible oral and oropharyngeal premalignant lesions in betel-nut chewing related oral cancer. *Head Neck* 2017; 39(7): 1428-1435.
71. Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR ve ark. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 7(7): CD001829.
72. Mak MP ve William WN Jr. Targeting the epidermal growth factor receptor for head and neck cancer chemoprevention. *Oral Oncol*. 2014; 50(10): 918-23.
73. Mann JE, Hoesli R, Michmerhuizen NL, Devenport SN, Ludwig ML, Vandenberg TR ve ark. Surveilling the Potential for Precision Medicine-driven PD-1/PD-L1-targeted Therapy in HNSCC. *J Cancer*. 2017; 8(3): 332-344.
74. Maruse Y, Kawano S, Jinno T, Matsubara R, Goto Y, Kaneko N ve ark. Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018; 47(7): 836-845.
75. Maymone MB, Greer RO, Kesecker J, Sahitya PC, Burdine LK, Cheng AD ve ark. Premalignant and Malignant Mucosal lesions: Clinical and Pathological Findings Part II. Premalignant and malignant mucosal lesions. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2018; 81: 59–71.
76. Mazon JJ, Ardiet JM, Haie-Méder C, Kovács G, Levendag P. ve Peiffert D. GEC-ESTRO recommendations for brachytherapy for head and neck squamous cell carcinomas. *Radiother Oncol*. 2009; 91: 150– 156.

77. Meulemans J, Delaere P ve Vander Poorten V. Photodynamic therapy in head and neck cancer: indications, outcomes, and future prospects. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019; 27(2): 136-141.
78. Mishra A. PD-1/PD-L1 biology and immunotherapy in HPV-positive oral cancers. *Future Oncol.* 2017; 13(22): 1907-1909.
79. Montero PH ve Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(3):491-508.
80. Mukai S, Moriya S, Hiramoto M, Kazama H, Kokuba H, Che XF ve ark. Macrolides sensitize EGFR- TKI- induced non-apoptotic cell death via blocking autophagy flux in pancreatic cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2016; 48: 45- 54.
81. Müller S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization of Head and Neck Tumours: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1):33-40.
82. National Comprehensive Cancer Network. Head and neck cancers (Version 3.2021). NCCN clinical practice guidelines in oncology. [https://www.nccn.org/login?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/head-and-neck.pdf](https://www.nccn.org/login?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf) Son erişim tarihi: 18.06.2021.
83. Norton N. Netter's Head and Neck Anatomy for Dentistry. Illustrations by Netter FH. Philadelphia, Pa.: Elsevier. 2017; p. 342-356.
84. Okada Y, Ueno H, Katagiri M, Oneyama T, Shimomura K, Sakurai S ve ark. Experimental study of antiangiogenic gene therapy targeting VEGF in oral cancer. *Odontology.* 2010; 98(1): 52-59.
85. Olson MA, Rogers RS 3rd ve Bruce AJ. Oral lichen planus. *Clin Dermatol.* 2016; 34(4): 495-504.
86. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2014; 19(3): 423-430.
87. Oun R, Moussa YE ve Wheate NJ. Correction: The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.* 2018; 47(23): 7848.
88. Pandey R, Mehrotra D. Retinoic acids in oral precancer: Utility and challenges. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol.* 2020; 32(6): 549-555.
89. Pandit P, Patil R, Palwe V, Yasam VR, Nagarkar R. Predictors of Weight Loss in Patients With Head and Neck Cancer Receiving Radiation or Concurrent

- Chemoradiation Treated at a Tertiary Cancer Center. *Nutr Clin Pract*. 2020; 35(6): 1047-1052.
90. Park ES, Shum JW, Bui TG, Bell RB ve Dierks EJ. Robotic surgery: a new approach to tumors of the tongue base, oropharynx, and hypopharynx. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2013; 25: 49–59.
  91. Peiris-Pages M, Sotgia F ve Lisanti MP. Doxycycline and therapeutic targeting of the DNA damage response in cancer cells: old drug new purpose. *Oncoscience*. 2015; 2, 696–699.
  92. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A ve Mitry RR. Introduction to cell culture. *Methods Mol Biol*. 2012; 806: 1-13.
  93. Piemonte ED, Lazos J, Belardinelli P, Secchi D, Brunotto M, ve Lanfranchi-Tizeira H. Oral cancer associated with chronic mechanical irritation of the oral mucosa. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018; 23(2): 151–160.
  94. Pignon JP, le Maître A, Maillard E ve Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009; 92: 4–14.
  95. Pollaers K, Kujan O, Johnson NW ve Farah CS. Oral and oropharyngeal cancer in Oceania: Incidence, mortality, trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. *Translat Res Oral Oncol* 2017; 2: 1–8.
  96. Porcheri C, Meisel CT ve Mitsiadis T. Multifactorial Contribution of Notch Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(6): 1520.
  97. Pulvino M, Chen L, Oleksyn D, Li J, Compitello G, Rossi R ve ark. Inhibition of COP9-signalosome (CSN) deneddylating activity and tumor growth of diffuse large B-cell lymphomas by doxycycline. *Oncotarget*. 2015; 6(17): 14796-14813.
  98. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A ve ark. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18(1): 41-58.
  99. Qi L, Luo Q, Zhang Y, Jia F, Zhao Y, Wang F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem Res Toxicol*. 2019; 32(8): 1469-1486.

100. Ribeiro FA, Noguti J, Oshima CT ve Ribeiro DA. Effective targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR) for treating oral cancer: a promising approach. *Anticancer Res.* 2014; 34(4): 1547-52.
101. Seethala RR. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Preface. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1):1-2.
102. Shen LC, Chen YK, Lin LM ve Shaw SY. Anti-invasion and anti-tumor growth effect of doxycycline treatment for human oral squamous-cell carcinoma--in vitro and in vivo studies. *Oral Oncol.* 2010; 46(3): 178-184.
103. Shirasaka T. Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1): its clinical usefulness and future vistas. *Jpn J Clin Oncol.* 2009; 39(1): 2-15.
104. Singh A, Dikshit R ve Chaturvedi P. Betel Nut Use: The South Asian Story. *Subst Use Misuse* 2020; 55(9): 1545-1551.
105. Socié G, Baker SK ve Bhatia S. Subsequent Malignant Neoplasms after Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18(1): 139– 150.
106. Song H, Fares M, Maguire KR, Sidén A ve Potáčová Z. Cytotoxic effects of tetracycline analogues (doxycycline, minocycline and COL-3) in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *PLoS One.* 2014; 9(12): e114457.
107. Song M, Wu H, Wu S, Ge T, Wang G, Zhou Y ve ark. Antibiotic drug levofloxacin inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biomed Pharmacother.* 2016; 84: 1137-1143.
108. Stîngă AC, Mărgăritescu O, Stîngă AS, Pirici D, Ciurea R, Bunget A ve ark. VEGFR1 and VEGFR2 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: a morphometric study. *Rom J Morphol Embryol.* 2011; 52(4): 1269-75.
109. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A ve ark. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3): 209-249.
110. Szturz P, Wouters K, Kiyota N, Tahara M, Prabhash K, Noronha V ve ark. Weekly Low-Dose Versus Three-Weekly High-Dose Cisplatin for Concurrent Chemoradiation in Locoregionally Advanced Non-Nasopharyngeal Head and Neck

- Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Aggregate Data. *Oncologist*. 2017; 22(9): 1056-1066.
111. Tamatani T, Ferdous T, Takamaru N, Hara K, Kinouchi M, Kuribayashi N ve ark. Antitumor efficacy of sequential treatment with docetaxel and 5-fluorouracil against human oral cancer cells. *Int J Oncol*. 2012; 41(3): 1148-56.
112. Tateya I, Tateya T, Surlles RL, Kanehira K, Tanumihardjo S ve Bless DM. Vitamin A deficiency causes metaplasia in vocal fold epithelium: a rat study. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008; 117(2): 153-158.
113. Tong D, Poot M, Hu D, Oda D. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in cultured oral cancer cells. *Oral Oncol*. 2000; 36(2): 236-41.
114. Tu G, Xu W, Huang H ve Li S. Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2008; 15(14): 1388-1395.
115. Türkiye Kanser İstatistikleri 2016.  
[https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye\\_Kanser\\_Istatistikleri\\_2016.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2016.pdf). Son erişim tarihi 18.06.2021
116. Vértessy BG ve Tóth J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc Chem Res*. 2009; 42(1): 97-106.
117. Villa A ve Woo SB. Leukoplakia- A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(4):723-734.
118. Villa A., Villa C. ve Abati S. Oral cancer and oral erythroplakia: An update and implication for clinicians. *Aust. Dent. J*. 2011; 56: 253–256.
119. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P ve Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther*. 2020; 206: 107447.
120. Walline HM, Komarck C, McHugh JB, Byrd SA, Spector ME, Hauff SJ ve ark. High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; 139: 1320–1327.
121. Wang C, Xiang R, Zhang X ve Chen Y. Doxycycline inhibits leukemic cell migration via inhibition of matrix metalloproteinases and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Mol Med Rep*. 2015; 12(3): 3374-3380.

122. Wang J, Xie T, Wang B, Heymach JV, El-Naggar AK, Myers JN ve ark. PD-1 Blockade Prevents the Development and Progression of Carcinogen- Induced Oral Premalignant Lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2017; 10(12): 684-693.
123. Wang LH, Wu CF, Rajasekaran N ve Shin YK. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(6):2647-2693.
124. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018; 125(6): 582-590.
125. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309–16.
126. Weiss BG, Ihler F, Anczykowski MZ, Bertlich M, Kitz J, Steiner W ve ark. Transoral laser microsurgery for treatment of oropharyngeal cancer in 368 patients. *Head Neck*. 2019; 41(9): 3144-3158.
127. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30(1): 87.
128. Wong T ve Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J*. 2018; 63(1): 91-99.
129. Yadav V, Varshney P, Sultana S, Yadav J, Saini N. Moxifloxacin and ciprofloxacin induces S-phase arrest and augments apoptotic effects of cisplatin in human pancreatic cancer cells via ERK activation. *BMC Cancer*. 2015; 15: 581.
130. Yao T ve Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*. 2017; 16(2): 99-117.
131. Ye M, Li X, Liu W, Tao H ve Yan J. Evaluating the efficacy and safety of continuous arterial infusion chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in treating oral cancer. *J Cancer Res Ther*. 2016; 12(Supplement): 47-49.
132. Yu M, Li R ve Zhang J. Repositioning of antibiotic levofloxacin as a mitochondrial biogenesis inhibitor to target breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 471(4): 639-45.
133. Zhang ZY, Sdek P, Cao J, ve Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2004; 33: 71-74.

134. Zhu C, Yan X, Yu A ve Wang Y. Doxycycline synergizes with doxorubicin to inhibit the proliferation of castration-resistant prostate cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2017;49(11):999-1007.



## HAM VERİLER



**FORMLAR**

## ETİK KURUL KARARI



**PATENT HAKKI İZİNİ**



**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**

## ÖZGEÇMİŞ

