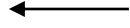


Adınızı soyadınızı giriniz

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



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



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ORAL LİKEN PLANUS OLGULARINDA P16 GEN
AKTİVASYONUNUN FLUORESANS IN SITU
HİBRİDİZASYON (FISH) VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
(IHC) YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

MELİS ERDOĞAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYHAN DEVİREN**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2016

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ORAL LİKEN PLANUS OLGULARINDA P16 GEN
AKTİVASYONUNUN FLUORESANS IN SITU
HİBRİDİZASYON (FISH) VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL
(IHC) YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

MELİS ERDOĞAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYHAN DEVİREN**

**2. DANIŞMAN
DR. AYŞE ÇIRAKOĞLU**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

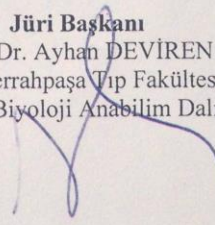
İSTANBUL-2016

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Melis ERDOĞAN tarafından Prof. Dr. Ayhan DEVİREN'in danışmanlığında hazırlanan "Oral Liken Planus olgularında p16 gen aktivasyonunun floresans in situ hibridizasyon (FISH) ve immunohistokimyasal (IHC) yöntemlerle değerlendirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27/12/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

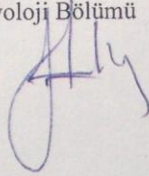
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ayhan DEVİREN
İ.Ü., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



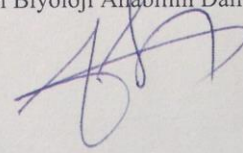
Jüri

Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN
İstanbul Aydın Üniversitesi,
Sağlık Bilimleri Fakültesi
Odyoloji Bölümü



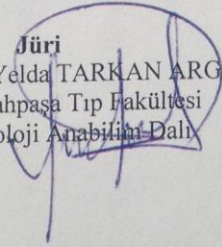
Jüri

Prof. Dr. Seniha HACIHANEFİOĞLU
İ.Ü., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



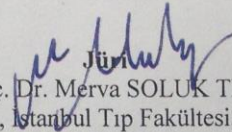
Jüri

Doç. Dr. Yelda TARKAN ARGÜDEN
İ.Ü., Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Jüri

Doç. Dr. Merva SOLUK TEKKEŞİN
İ.Ü., İstanbul Tıp Fakültesi,
Tümör Patolojisi ve
Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MELİS ERDOĞAN

İTHAF

Biricik anneannem Saide BİRECİKLİ'ye ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, her zaman desteğini hissettiğim, bilimsel açıdan örnek aldığım başta tez danışmanım, sayın Prof. Dr. Ayhan Deviren'e,

Eğitimimde rol oynayan ve bilgisi ile bana yol gösteren sayın hocam Prof. Dr. Seniha Hacıhanefioğlu'na,

Çalışmanın başından sonuna her aşamasında, değerli bilgi ve deneyimiyle bana destek olan, benden bilgi, yardım ve sıcaklığını hiç bir zaman esirgemeyen, sayın hocam Doç. Dr. Merva Soluk Tekkeşin'e,

Bulgularımın istatistiksel değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı, sayın Prof. Dr. Rian Dişçi'ye,

Eğitimim boyunca her zaman deneyimlerinden yararlandığım, bilgi ve birikimlerini bana aktaran ikinci danışmanım, sayın Dr. Ayşe Çırakoğlu'na,

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum ve her konuda bana gösterdikleri destek için C.T.F. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın sevgili Sitogenetik ailesine ve sağladıkları sıcak çalışma ortamı ve her konuda destekleri için, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı ailesine,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan, yardım ve desteklerini hiç bir zaman esirmeyen canım dostlarım, Bengisu Gökkaya, Selin Coşkun, Msc. Sezen Atasoy, Msc. Seda Öden, Msc. Gülendam Bagirova, Msc. Başak Aslaneli Çakmak, Msc. Cemre Sandal, Aysu Ünal ve Esra Kırıkkaya'ya,

Varlığıyla hayatımı güzelleştiren, huzur ve mutluluk kaynağım olan yol arkadaşım Seçkin Saral'a,

Son olarak, hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni bugünlere emek, fedakarlık ve sabırla getiren annem Fatma Erdoğan'a ve babam Semih Erdoğan'a, biyolojiyi bana sevdiren eniştem Sargun Özveren'e ve akademik bilgisiyle bana yol gösteren halam Dr. Ayla Özveren'e gönülden sonsuz teşekkür ve saygılarımla...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **2682**

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XII
ÖZET	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. BAŞ BOYUN KANSERLERİ.....	4
2.2. BAŞ BOYUN KANSERLERİ İÇİNDE ORAL MUKOZA.....	5
2.3. ORAL MUKOZA İÇİNDE PREKANSERÖZ LEZYONLAR.....	5
2.3.1. Prekanseröz Lezyonlar	6
2.3.1.1. Lökoplaki	6
2.3.1.2. Eritroplaki	7
2.3.1.3. Ters Sigara İçimine Bağlı Gelişen Damak Lezyonları	8
2.3.2. Prekanseröz Durumlar.....	8
2.3.2.1. Submukozal Fibrozis.....	8
2.3.2.2. Aktinik Keratoz	8
2.3.2.3. Diskoid Lupus Eritematozus	8
2.3.2.4. Oral Liken Planus.....	9
2.3.2.4.1. OLP'nin Epidemiyolojisi	12
2.3.2.4.2. OLP'nin Histopatolojisi	12
2.3.2.4.3. Patogenez	13
2.3.2.4.4. Etiyoloji.....	14
2.3.2.4.4.1. Dental Restoratif Materyaller.....	14
2.3.2.4.4.2. İlaçlar.....	14

2.3.2.4.4.3. Psikolojik Durum	14
2.3.2.4.4.4. Enfeksiyon ajanları.....	15
2.3.2.4.4.5. Sistemik Hastalıklar	15
2.3.2.4.4.6. Tütün ve Alkol Kullanımı	16
2.3.2.4.5. OLP'nin Klinik Tipleri.....	17
2.3.2.4.5.1. Retiküler Tip OLP	18
2.3.2.4.5.2. Atrofik (Eritamatöz) Tip OLP	18
2.3.2.4.5.3. Eroziv (Ülseratif, Büllöz) Tip OLP	18
2.3.2.4.6. OLP'nin Ekstraoral Tutulumu	19
2.3.2.4.7. OLP nin Tedavisi ve Prognozu	19
2.3.2.4.8. OLP ile Malignite İlişkisi.....	20
2.4. ORAL MUKOZA KARSİNOMLARI	22
2.5. KARSİNOGENEZ.....	24
2.6. HÜCRE SİKLUSU	24
2.6.1. Siklinler.....	26
2.7. SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ 2A (CDKN2A) / P16 ^{INK4A}	27
2.8. FLUORESANS IN SITU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ.....	30
2.8.1. FISH Problemleri	32
2.8.1.1. Tüm Kromozom Boyama Problemleri (Kromozom Koluna Spesifik Prob)	33
2.8.1.2. Lokusa Özgü Problemler.....	33
2.8.1.3. Tekrarlayan Dizi (Alfa Satellit) Problemleri.....	33
2.8.1.4. Tümör Problemleri	34
2.9. İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM	34
2.9.1. Direkt İmmünohistokimya Yöntemi	34
2.9.2. İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. GEREÇLER.....	36
3.1.1. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Gereçler	36
3.1.2. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Cam Malzemeler	36
3.1.3. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.4. IHC Yönteminde Kullanılan Antikor.....	37
3.1.5. FISH Yönteminde Kullanılan Prob.....	37
3.1.6. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar.....	37

3.1.6.1. IHC Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar	37
3.1.6.2. FISH Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar	38
3.2. YÖNTEMLER.....	39
3.2.1. Materyal Seçimi	39
3.2.2. Floresans in situ hibridizasyon (FISH) Yöntemi	40
3.2.2.1. FISH Yönteminde Preparatların Deparafinizasyonu ve Denatürasyonu	40
3.2.2.2. FISH Yönteminde Prob Denatürasyonu.....	41
3.2.2.3. FISH Yönteminde Hibridizasyon.....	41
3.2.2.4. FISH Yönteminde Posthibridizasyon Yıkama	41
3.2.2.5. FISH Yönteminde Hibridizasyon Sonrası DNA Boyasının Uygulanması ..	41
3.2.2.6. FISH Yönteminde Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	42
3.2.2.7. FISH Yönteminde Sinyallerin Değerlendirilmesi.....	42
3.2.2.8. İnterfaz FISH Skorlama	43
3.2.3. İmmunohistokimyasal (IHC) Yöntemi	43
3.2.3.1. IHC Yönteminde Kesit Alma.....	43
3.2.3.2. IHC Yönteminde Preparatların Deparafinizasyonu ve Dehidratasyonu	44
3.2.3.3. IHC Yönteminde Preparatların Yıkama ve Boyanması	44
3.2.3.4. IHC Yönteminde Preparatların Mikroskopta İncelenmesi.....	45
3.2.3.5. IHC Yönteminde Preparatların Değerlendirilmesi.....	45
3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme	46
4. BULGULAR.....	47
4.1. Olguların 9p21.3 için FISH Bulgularının Değerlendirilmesi	50
4.2. Olguların 9p21 için IHC Bulgularının Değerlendirilmesi	54
4.3. Olguların 9p21 için FISH ve IHC Bulgularının İstatistiksel Analizi	55
5. TARTIŞMA	62
KAYNAKLAR	72
FORMLAR	83
ETİK KURUL KARARI	84
ÖZGEÇMİŞ	85

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: WHO tarafından prekanseröz lezyonlar ve durumların sınıflandırılması.....	6
Tablo 2-2: WHO'nun OLP için 1978'de yapmış olduğu tanı kriterleri	10
Tablo 2-3: 2003 yılında WHO tarafından düzenlenmiş OLL ve OLP'nin tanı kriterleri11	
Tablo 2-4: 1972- 2014 yılları arasında OLP ile malign değişim ilişkisi	21
Tablo 3-1: Posthibridizasyon yıkama solüsyonları.....	38
Tablo 3-2: Hibridizasyon sonrası görüntüleme solüsyonları	39
Tablo 4-1: Çalışma grubu olgularının cinsiyet, yaş, biyopsi lokalizasyonu ve klinik bulguları (n=20)	48
Tablo 4-2: OLP olgularının 9p21 FISH ve IHC analiz sonuçları	51
Tablo 4-3: YEHK olgularının 9p21 FISH ve IHC analiz sonuçları	52
Tablo 4-4: Sağlıklı bireylerin 9p21 FISH ve IHC analiz sonuçları	53
Tablo 4-5: OLP ve YEHK olgularının FISH bulgularında görülen anomali yüzdeleri..	53
Tablo 4-6: Olguların IHC Bulguları	55
Tablo 4-7: Olguların FISH yöntemiyle dizomi, monozomi, hemizigot delesyon bulgularına göre istatistiksel analiz sonuçları	56
Tablo 4-8: Olguların FISH yöntemiyle homozigot delesyon, tetrazomi bulgularına göre istatistiksel analiz sonuçları	56
Tablo 4-9: Olguların FISH yöntemiyle trizomi ve amplifikasyon bulgularına göre istatistiksel analiz sonuçları	57
Tablo 4-10: Olguların IHC bulguları ve istatistik analiz sonuçları	57
Tablo 4-11: Olgu gruplarının FISH ve IHC sonuçlarına göre korelasyon analizi.....	58

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Hücre siklusu.....	25
Şekil 2-2: 9. kromozoma ait ideogram üzerindeki p16 gen lokalizasyonu.....	27
Şekil 2-3: CDKN2A lokusu ve hücre siklus kontrol mekanizması	28
Şekil 2-4: FISH protokolü.....	32
Şekil 3-1: Kullanılan p16 gen probunun şematik görünümü:.....	42
Şekil 4-1: OLP'nin lokalizasyona göre dağılımı	48
Şekil 4-2: Olguların IHC yönteminde primer p16 antikoruyla boyanma yüzdeleri:	54
Şekil 4-3: Çalışma grubumuzdan OLP 2 olgusunun 9p21 için FISH ve IHC görüntüsü:	59
Şekil 4-4: Çalışma grubumuzdan OLP 16 olgusunun 9p21 için FISH ve IHC görüntüsü	59
Şekil 4-5: Pozitif kontrol grubundan YEHK 11 olgusunun FISH ve IHC görüntüsü: ...	60
Şekil 4-6: Negatif kontrol grubundan sağlıklı 10 olgusunun FISH ve IHC görüntüsü. .	61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BAC	Bakteri Yapay Kromozomları
BBK	Baş Boyun Kanseri
BBYEHK	Baş Boyun Yassı Epitel Hücreli Karsinom
DAPI	4',6' - diamino-2-fenilindol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DLE	Diskoid Lupus Eritematozus
FISH	Fluoresans in situ Hibridizasyon
HCV	Hepatit C virüsü
HPV	Human Pailloma virüsü
IHC	İmmunohistokimya
LOH	Heterozigozite kaybı
LP	Liken Planus
OLL	Oral Likenoid Lezyon
OLP	Oral Liken Planus
OSF	Oral Submukozal Fibrozis
PAC	Plazmid Yapay Kromozomları
TBG	Tümör Baskılayıcı Gen
YAC	Maya Yapay Kromozomları
YEHK	Yassı Epitel Hücreli Karsinom
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
µl	Mikrolitre

ÖZET

Erdoğan, M. (2016). Oral Liken Planus olgularında p16 gen aktivasyonunun floresans in situ hibridizasyon (FISH) ve immunohistokimyasal (IHC) yöntemlerle değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Oral liken planus (OLP), etiyolojisi tam olarak bilinmeyen ve genel popülasyonun % 1- 2'sini etkileyen, kronik inflamatuvar ağız mukoza hastalığıdır. Premalign lezyon olarak da tanımlanan OLP'nin, tekrarlayan karsinojen uyarılarla 10 ile 15 yıl içerisinde % 0,5 - 2,2 oranında malign transformasyon göstererek YEHK'ya dönüşümü rapor edilmiştir. YEHK'nın oluşum mekanizması; genetik ve epigenetik değişiklikler, heterozigote kaybı, metilasyon ile gen inaktivasyonu, gen amplifikasyonu, nokta mutasyonları gibi çok basamaklı şekillerde gerçekleşmektedir. 9p21 bölgesinde lokalize olan p16 (CDKN2A) geni, hücre siklus mekanizmasında yer alan önemli bir tümör baskılayıcı gendir. Baş boyun kanserlerinin %70-80'inde 9p21 bölgesinin kaybı bulunmaktadır. Oral kavitenin primer tümörlerinde ve premalign lezyonlarında, p16 inaktivasyonu bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, OLP olgularının patogeneğinde p16 gen aktivasyonunun FISH ve IHC yöntemleriyle araştırılarak maligniteye dönüşümde yeri olup olmadığının incelenmesidir. FISH yöntemiyle incelenen 20 OLP olgusu ile normal mukoza ve YEHK olguları ile normal mukoza arasında dizomi, monozomi ve hemizigot delesyon bulguları için, anlamlı bir farklılık gözlenirken ($p < 0.05$), OLP ve YEHK olgu grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p > 0.05$). OLP olguları ile YEHK olguları arasında homozigot delesyon, tetrazomi, amplifikasyon ve trizomi bulguları için anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p > 0.05$). IHC yöntemiyle incelenen OLP olgularında normal mukozaya göre artmış p16 ekspresyonu gözlenirken, OLP olguları ile YEHK'li olguları arasında benzer p16 ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Sonuç olarak, p16 geninde gözlenen değişimlerin, premalign lezyon sınıfından olan OLP'nin olası malign dönüşümünün belirlenmesinde önemli bir faktör olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler : oral liken planus, yassı epitel hücreli karsinom, floresans in situ hibridizasyon, immunohistokimya, p16

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **2682**

ABSTRACT

Erdoğan, M. (2016). Assessment of p16 gene activation by fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC) in oral lichen planus. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Msc Thesis. İstanbul.

Oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease of the oral mucosa with unknown aetiology. It generally affects 1- 2% of the world's population. OLP, also defined as premalignant lesions, has been reported with a rate of 0,5- 2,2% malign transformation within 10-15 years after recurrent carcinogen stimulus. The mechanism of OSCC formation has a multistage forms. These are genetic, epigenetic changes, loss of heterozygosity, gene inactivation by methylation, gene amplification and point mutation. p16 gene (CDKN2A), located at 9p21 region, is an important tumor suppressor gene involved in the cell cycle mechanism. 70- 80% of head and neck cancer patients have the loss of 9p21. The p16 inactivation has been reported in primary tumors and premalignant lesions of the oral cavity. The purpose of this study was to search the p16 gene activation by FISH and IHC methods in OLP cases to determine the pathogenesis of OLP and investigate role of p16 gene in malignant transformation. OLP and OSCC cases in comparison with normal mucosa were significantly different ($p<0,05$) for disomy, monosomy and hemizygous deletion by FISH method. However OLP and OSCC were not significantly different for disomy, monosomy, hemizygous and homozygous deletion, tetrazomy, amplification and trizomy ($p>0,05$). OLP was shown increased p16 expression to compared to the normal mucosa and OLP and OSCC cases showed similar level of p16 expression by IHC method ($p>0,05$). In conclusion, the changes observed in p16 gene of OLP cases suggest that it is an important factor for determining possible malignant transformation.

Key Words: oral lichen planus, oral squamous cell carcinoma, fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, p16

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Prpject No: **2682**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Liken planus (LP); deri, saç ve tırnaklarda etkili olan, inflamatuvar mukokütanöz bir hastalıktır. LP'nin sadece oral bölgeyi etkilediği vakalar da sıkça gözlenmektedir ve 'Oral Liken Planus' (OLP) olarak adlandırılır. Oral liken planus etiyolojisi bilinmeyen, kronik inflamatuvar ağız mukozası hastalığıdır (1). Prekanseroz mukokütanöz bir lezyon olarak da değerlendirilen OLP'nin tekrarlayan karsinojen uyarılarla malign transformasyonu rapor edilmiştir (2).

Hastalığın dünya popülasyonunda görülme prevalansı %1 ile %2 arasında değişmekle birlikte, kadınlarda erkeklere göre 2 kat daha fazla gözlenmektedir (3, 4).

Oral kavitede çeşitli bölgelerde görülmesine rağmen özellikle yanak mukozasında, dilin lateral kısımlarında, diş etinde sıklıkla gözlenmektedir (5). OLP'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, liken planus için otoimmünite, immün yetmezlik, gıda alerjileri, alkol ve tütün kullanımı, stress, genetik yatkınlık, ilaçlar, tramva, bakteriler, virüsler, diyabet ve hipertansiyon etiyolojik faktörlerden bazıları olarak kabul edilmektedir (6).

OLP lezyonları sıklıkla spesifik klinik bulgulara ve dağılıma sahiptirler. Başlıca; retiküler, eritematöz-atrofik ve eroziv tip olarak sınıflandırılmaktadır. Bu klinik tipler değerlendirildiğinde, oral mukozanın erozyonu veya kronik atrofisi sonucunda düşük oranda da olsa displazik değişiklikler gelişebileceği ve bu nedenle düzenli olarak takip altına alınmaları gerektiği bildirilmiştir (7).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan sınıflamada, oral kanserlerin 'önlenebilir kanserler' grubunda yer almasının en önemli nedenleri, tanımlanan risk faktörlerinden tütün ve alkol kullanımının engellenebilir olmasıdır (8).

Birçok yassı epitel hücreli karsinomun (YEHK), bir premalign fazdan geçtiği gözlenmiştir. Buna karşın bir diğer oluşum mekanizması ise önceden var olan bir lezyonun klinik ve mikroskopik bulgusu olmadan de novo olarak gelişmesidir. Bu durum sonucunda, çok düşük oranda da olsa malign transformasyon riski olduğu kabul edilen OLP lezyonlarının, takip altında tutulmaları, vakalarda oluşabilecek YEHK'nın erken tanısı için önemlidir (2, 9).

Karsinogenezin temelinde, çevresel maruziyet sonucu somatik hücre için öldürücü olmayıp mutasyona neden olan genetik hasar bulunmaktadır. Genetik hasarın asıl hedefinde, büyümeyi uyaran protoonkogenler (onkogenlerin normal hücresel formu), büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genler (TBG) ve programlı hücre ölümünü (apoptoz) ve DNA tamir mekanizmasını düzenleyen genler vardır. Kavramsal olarak, oral kanserlerin oluşması, iki önemli biyolojik aşamada meydana gelir. İlk aşamada, azalan apoptoz ve artan proliferasyon ile hücre çoğalmasının kontrolünün kaybolmasıdır. İkinci aşamada ise, tümör hücrelerinin kazandıkları yeni yeteneklerle metastaz ve invazyona yol açabilmesidir. Her iki aşama da, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucunda meydana gelir (9, 10).

9. kromozomun kısa kolunda, 9p21 bölgesine yerleşmiş olan p16 (CDKN2A) tümör baskılayıcı geni, hücre siklus mekanizmasının merkezinde yer alan önemli bir siklin bağımlı kinaz inhibitörünü kodlar. Baş-boyun kanserlerinin %70-80'inde 9p21 bölgesinin kaybı bulunmaktadır ve bu değişim baş-boyun bölgesinin yassı epitel hücreli karsinomlarında ve epitel displazilerinde en sık görülen genetik değişikliktir. Oral kanser ve oral premalign lezyonlar da dahil olmak üzere bir çok farklı tümör ve premalign lezyonda p16 inaktivasyonu gösterilmiştir. p16 inaktivasyonunun, homozigot delesyon veya metilasyon sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir (11).

p16 gen ürünleri CDK4 ve CDK6 siklin bağımlı kinaz proteinlere bağlanarak, bu moleküllerin siklin D1 ile olan ilişkilerini negatif yönde etkiler. Siklin D1 ve CDK4/6 komplekslerinin inhibisyonu retinoblastoma proteininin fosforilasyonunu engeller ve döngünün G1/S geçişinin duraksatılmasına sebep olur. p16'nın inaktivasyonu hücre proliferasyonunu arttırmakta ve malignitenin gelişimine katkıda bulunmaktadır. p16'nın artmış ekspresyonunun derinin ve oral kavitenin displastik lezyonlarının tanısında faydalı olabileceğini gösteren çalışmalar olduğu kadar, azalmış ekspresyonunun tanısal önemini vurgulayan çalışmalar da mevcuttur (12).

Bu çalışmada, OLP'nin patogenezinde ve malign dönüşümünde, p16 gen bölgesindeki değişimlerin ve protein ekspresyonun araştırılması amaçlanmıştır. İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı arşivinden seçilmiş 20 OLP olgusuna ait doku kesitlerine ek olarak, 20 YEHK pozitif kontrol grubu ve 10 normal mukoza da negatif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Çalışma gruplarında, p16 gen değişimleri floresans in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle ve

protein ekspresyon seviyeleri ise immünohistokimya (IHC) yöntemiyle incelenmesi hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. BAŞ BOYUN KANSERLERİ

Baş boyun kanserleri (BBK), dünya genelinde en sık rastlanan 6. malign tümör olmakla birlikte, endüstrileşmiş ülkelerde bütün kanserlerin yaklaşık olarak %3'ünü oluşturmaktadır. BBK'in yaklaşık %50'si ağız boşluğunda görülmektedir ve bu kanserlerin yaklaşık %95'ini yassı epitel hücreli karsinom (YEHK)'lar oluşturmaktadır (13). Ayrıca BBK; dudak, dil, burun ve paranasal sinüs, tükrük bezi, orofarinks, nazofarinks, hipofarinks, larinks, özafagus, kulak ve boynun yumuşak dokusu gibi dokularda da gözlenebilmektedir. BBK, erkeklerde kadınlara göre 4 kat daha fazladır (14).

Baş boyun yassı epitel hücreli karsinomları (BBYEHK), dünya genelinde, yıllık yaklaşık olarak 600.000 olguda görülür ve bu olguların %40 ile %50'sinde 5 yıllık sağ kalım gözlenir (15). En sık rastlandığı ülkeler, Hindistan, Çin, Filipinler, Fransa, Macaristan ve Brezilya'dır. BBK'nın en önemli risk faktörleri arasında tütün ve alkol kullanımına ek olarak, güneş ışınlarına maruz kalma, iyonize edici radyasyon, dental travma, kötü ağız hijyeni, beslenme, viral ajanlar ve genetik bozukluklar sorumlu tutulmaktadır (14, 16, 17). Dünya'da gözlemlenen yassı epitel hücreli baş boyun kanser (BBYEHK)'leri 1/4 oranla human papilloma virusü (HPV), özellikle HPV16 ile ilişkilendirilmiştir. HPV ilişkili olan BBYEHK'li olgularda daha az genetik değişikliklere rastlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, 300'ün üzerinde farklı tip baş boyun kanserli olgu sitogenetik analiz ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kesin bir bölgesi olmaksızın, çok fazla benzer kromozom değişikliklerinin gözlenmesi, bu tip kanserlerin benzer patolojik yollarla oluştuğunu düşündürmüştür (18).

Diğer tümörler gibi BBYEHK de, tümör baskılayıcı gen (TSG), onkogen ve genom bütünlük genleri gibi kanserle ilişkili genlerin bozuklukları ile oluşur. BBYEHK'de tümör oluşumu ve ilerlemesinin; kromozoma delesyonlarının birikimi, yeniden düzenlenmesi ve amplifikasyonlar sonucu oluştuğu gözlenmiştir (18, 19).

Califano ve ark. yaptıkları mikrosatellit analizinde, histopatolojik olarak farklı olan fakat birbirine yakın tümörlerin ortak genetik değişiklikleri içerdiğini, benign hiperplaziden, invaziv kansere kadar her bir histopatolojik aşamada kromozom kaybının arttığını göstermişlerdir. Aynı zamanda çevresindeki mukoza hücrelerinde de bu

lezyonlarla ortak genetik değişiklikler gözlenmiş ve bunların tek bir progenitor hücreden kaynaklandığını belirlemişlerdir (19).

Sitogenetik anomaliler, malignitelerin teşhis ve prognozunda yararlı biyomarkerdir. BBYEHK’de sıklıkla görülen yapısal kromozom anomalileri; delesyonlar, translokasyonlar, izokromozomlar ve tanımlanamayan marker kromozomlardır. Daha az sıklıkta ise duplikasyonlar, insersiyonlar, inversiyonlar, ring, disentrik ve endoreduplikasyonlar görülmüştür. Ayrıca BBYEHK’de 1p13 ve 11q13’te kırıklar görülmüştür. En sık gözlenen yapısal yeniden düzenleme, iki kromozomun sentromerlerinin kırılması ve birleşmesi sonucu oluşan “robertson tipi translokasyon” ya da tüm kol translokasyonları sonucunda izokromozomlardır. Bu yapısal değişiklikler özellikle 3p, 5p, 7p, 8p ve 9p’de görülmektedir. BBYEHK’de izokromozom oluşumu sıklıkla 3p, 8p ve 9p’de kromozomun kol kaybına yol açar. BBYEHK’de en sık oluşan kromozom artışı 3q’nun distalinde, kromozom kaybı ise 3p’de gözlenmektedir. Yine sık gözlenen bir sonraki kromozom artışları ise 5p, 7p, 8q ve 9q kromozomlarında bulunmaktadır (18, 20). Ayrıca yapılan çalışmalarda, BBYEHK olgularında %70- 80 oranında 9p21 delesyonu gözlenmektedir (21).

2.2. BAŞ BOYUN KANSERLERİ İÇİNDE ORAL MUKOZA

Gelişmiş ülkelerde 8., gelişmekte olan ülkelerde ise 2. sırada olan oral kanserler, dünyada 6. sırayı teşkil etmektedir. Simard ve ark.’nın 2014 yılında yayınladıkları çalışmada, Japonya, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Finlandiya, İngiltere, Slovak Cumhuriyeti ve Estonya gibi bazı ülkelerde, BBK içindeki oral kanser oranının hem kadın hem de erkek olgularda arttığı bildirilmiştir. BBK içindeki oral kanserlerin en sık rastalanan tipi yassı epitel hücreli karsinomdur (YEHK). Genetik faktörler YEHK etiyojolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca çevresel faktörler de hastalığın başlamasında tetikleyici risk faktörleridir. Oral mukoza epitelinde prekanseröz lezyonlar, prekanseröz durumlar ve karsinomlar izlenebilir (22, 23).

2.3. ORAL MUKOZA İÇİNDE PREKANSERÖZ LEZYONLAR

Oral kanseröz lezyonların tanısı genellikle kolaydır, ancak prekanseröz lezyonların ve durumların erken teşhisi değişkendir. Prekanseröz lezyonlar, oral kavitenin kronik lezyonlarıdır ve kanser gelişiminde rol aldığı bilinmektedir. Bu lezyonlar; oral liken planus, eritroplaki, bazı papillomatöz lezyonlar, aktinik şilozis, submukozal fibrozis, keratotik candidiasis ve tersiyer sifiliz’dir. Prekanseröz durumlar,

herhangi bir bağıışıklığın baskılandığı durumlarda veya yaşam tarzıyla ilişkili diğer durumlarda oral kavitede zaman zaman gözlenmiştir (24).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun 2005 yılında düzenlemiş olduğu çalışmada, oral lezyonların terminolojisi, tanımları, sınıflandırılması ve malign dönüşüme yatkınlığı ele alınmıştır. 'Potansiyel olarak malign' terimi, "prealign" veya "prekanseröz" terimlerine karşı tercih edilmiştir. Buna ek olarak, potansiyel malign lezyonlar ve potansiyel malign durumlar arasındaki geleneksel ayrımı bırakarak, yerine "potansiyel malign bozukluklar" teriminin kullanılması önerilmiştir (Tablo 2-1) (25, 26).

Tablo 2-1: WHO tarafından prekanseröz lezyonlar ve durumların sınıflandırılması

Warnakulasuriya S. (26)'den

Prekanseröz Lezyonlar • Lökoplaki • Eritroplaki • Ters Sigara içimine bağlı gelişen damak lezyonları
Prekanseröz Durumlar • Submukoz fibrozis • Aktinik Keratoz • Diskoid Lupus Eritematosus • Liken Planus

2.3.1. Prekanseröz Lezyonlar

2.3.1.1. Lökoplaki

Lökoplaki, klinik olarak acıklanamayan beyaz lezyonlar olarak tanımlanan ve oral mukozada en sık gözlemlenen prekanseröz lezyondur ve klinik bir ifadedir. 2002 yılında yapılan çalışmada, belirli etiyolojik faktörlere bağlı gelişmiş olan bu lezyonların, etiyolojik faktörleri (sigara kullanımı gibi) 2-4 hafta süreyle uzaklaştırılmasıyla

kaybolmadığı gözlenmiştir. Scheifele ve arkadaşlarının 16,128 kişiyle yapmış oldukları çalışmada erkeklerde %0.66 prevelans gözlenirken, kadınlarda %0,21 görülmektedir. En sık etkilenen bölgeler yanak mukozası ve dildir (27, 28). Oral lökoplakinin dünya çapındaki tahmini prevelansı %2'dir. Ancak, yıllık malign transformasyon oranı %1 olduğu halde, her yıl 100,000 nüfustan her 20 kişi oral kansere yakalanmaktadır. Lökoplaki sigara içmeyenlere oranla sigara içenlerde 6 kat daha sık gözlenmektedir. Alkol ise bağımlılığa veya az tüketime bakılmaksızın bağımsız bir risk faktörüdür, ve özellikle sigara ile beraber kullanıldığında sinerjik bir etki yaratır. HPV enfeksiyonunun olası rolüne ilişkin çalışmaların çelişkili sonuçları bulunmaktadır (25, 28).

Klinik olarak lökoplaki, düz, ince, düzgün beyaz renkte olan homojen tip ve eritroplaki gibi kırmızı ve beyaz renkte, nodular veya düzensiz (benekli) yayılan homojen olmayan tip olarak ikiye ayrılır. Homojen olmayan lökoplakilerin homojen lökoplakilere göre malign transformasyon riskleri çok daha yüksektir (25). WHO tarafından lökoplaki, 'kazımayla yerinden kaldırılamayan ve herhangi başka bir hastalıkla klinik yada patolojik olarak karakterize edilemeyen beyaz parça veya plak' olarak tanımlanmaktadır. Lökoplakinin yaşla birlikte prevelansı artmakta olup, yaşlı erkeklerde ve en sık olarak da orta yaşlı erkeklerde gözlenmektedir. En yaygın olarak, yanak mukozası, alveolar mukoza ve alt dudakta görülür, ancak lezyonlar ağız içinde, dilin lateral kısımlarında ve alt dudakta displazi veya malign değişim gösterebilmektedir (29).

Bilinen en yaygın etiyolojik faktörleri; tütün ürünleri, tütün-alkol kullanımı, betel-quid çiğnenmesi gösterilmektedir. Bir diğer neden olarakta *Candida albicans* ve HPV sorumlu tutulmaktadır ancak ikisi de tartışmalıdır (22).

2.3.1.2. Eritroplaki

Eritroplaki 'klinik veya patolojik herhangi bir başka hastalıkla karakterize edilemeyen parlak kırmızımsı renkli, kadifemsi plaklar' olarak tanımlanmaktadır. Tütün ve alkol önemli etiyolojik faktörler arasında olup, *Candida albicans*'ın olası rolü tam olarak bilinmemektedir. Eritroplaki çok daha fazla malign değişime uğrayan lezyon olarak da tanımlanabilir. Bu nedenle, eritroplaki yüksek riskte malign değişimi nedeniyle tedavi edilmesi gerekmektedir (25). Ağız içinde, dilin yan kısmı, retromolar bölge ve yumuşak damak en sık gözlenen yerlerdir. Genellikle lezyon iyi sınırlanmıştır, ancak bazı örnekler kademeli olarak mukozaya yayılım gösterebilir. Bazı lezyonlar

beyaz bölgelerle karışmış olabilir, bu da eritrolököplaki olarak adlandırılır. Bazı hastaların şiddetli, yanıcı histen şikayet etmelerine rağmen, eritroplaki genellikle asemptomatiktir (29).

2.3.1.3. Ters Sigara İçimine Bağlı Gelişen Damak Lezyonları

Bazı toplumlara spesifik olan bu hastalıkta, yanan ucu ağız içine gelecek şekilde kullanılan sigara ve puro, damakta kırmızı, beyaz veya karışık lezyonlar meydana getirmektedir. Bu alışkanlık ile ilgili tüm değişiklikler damakta belirtilmiştir (26).

2.3.2. Prekanseröz Durumlar

2.3.2.1. Submukozal Fibrozis

Oral submukozal fibrozis (OSF) oluşumu daha çok Güneydoğu Asya ile sınırlandırılmış olmasına rağmen, Güney Afrika, Yunanistan ve Birleşik Krallık gibi dünyanın farklı bölgelerinden de olgular rapor edilmiştir. Bu hastalığın oluşmasındaki en büyük nedenlerin başında tütün çiğneme gelmektedir. Klinik olarak, OSF’de yanma hissiyle karakterize olup, trismus, orofarenks ve oral mukozanın sertleşmesi ve beyazlaşması gözlenmektedir. İleri evrelerde yanakta, bademcikte ve dudağın çevresinde, vertikal fibröz bantlar gözükür. Henüz tam olarak bilinmeyen süreç sonunda, lamina propria’da fibrozis ve hiyalinizasyon meydana gelerek, üzerlerindeki epitelde atrofiye neden olur. Atrofik epitel, karsinogenez varlığında yassı epitel hücreli karsinomun gelişimine zemin hazırlayabilir. Uzun süreli bir çalışmada, malign değişim oranı yıllık %0.5 olarak bildirilmiştir (25).

2.3.2.2. Aktinik Keratoz

Aktinik keratoz, dudağın potansiyel malign değişimi olarak kabul edilmektedir. Dudak vermilyonunun skuamöz epiteli, hiperplastik veya atrofik olabilir. Klinik olarak, bu kesinleşmemiş tanı ayırt edici olabilir, ancak kesin tanı için biyopsi yapılması gerekmektedir. Mikroskobik incelemede artan mitotik aktivite, sitolojik atipi ile, değişen derecede keratinizasyon ve düzensiz bir maturasyon gözlemlenir. Altta bulunan bağ dokusunda genellikle kollajen ve elastozun bazofilik dejenereasyonu gözükmektedir (26).

2.3.2.3. Diskoid Lupus Eritematozus

Diskoid lupus eritematozus (DLE), etiyolojisi tam olarak bilinmeyen otoimmün bir hastalıktır. DLE’yi klinik olarak liken planus ve eritroplaki’den ayırmak bazen zor

olabilmektedir. Literatürde oral DLE'nin malignite potansiyeli olup olmadığına dair çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. DLE'nin dudağa göre ağız içi bölgesinde malign değişimi gözlemlendiği rapor edilmiştir (26).

2.3.2.4. Oral Liken Planus

Liken Planus (LP), yunanca ağaç yosunu anlamında gelen "leichen" ve latince düz/yassı anlamına gelen "planus" sözcüklerinden oluşmuştur. İlk olarak 1869 yılında Erasmus Wilson tarafından tanımlanmış olan LP, deriyi, saç derisini, mukozayı ve tırnakları etkileyen, inflamatuvar mukokütanöz bir hastalıktır. 1895 yılında, Wickham, LP lezyonlarının üzerindeki beyaz çizgileri keşfetmiştir. Dubreuilh tarafından 1906 yılında da, oral mukozada LP lezyonlarının histolojik özellikleri tanımlanmıştır, 1972 yılında ise Shklar tarafından düzenlenmiştir (1, 30).

LP, farklı coğrafi bölgelere göre değişik prevalans gösterir, ancak genel olarak popülasyonun yaklaşık %1 ile %2'sini etkilenmektedir (1, 31, 32). Oral mukozayı etkileyen LP, oral liken planus (OLP) olarak tanımlanır. Yapılan bazı araştırmalara göre, deri tutulumu gözlenmeyen izole OLP olgularının daha sık ortaya çıktığı bildirilmiştir (1, 33). OLP, etiolojisi tam olarak bilinmeyen, oral mukozayı tutan, bir otoimmün hastalıktır. OLP, T hücre aracılığıyla bazal keratinositlerin altında lenfositlerin birikmesi ve yassı epitelin hızlı dejenerasyonu sonucu oluşan hiperkeratoz ile sonuçlanır (34, 35). OLP'nin histopatolojik özellikleri bazal hücre tabakasının hidropik dejenerasyonu, hiperkeratoz, akantoz, düzensiz çizgiler ve özellikle lamina propriada T lenfositlerinin bant şeklinde infiltrasyonudur (36).

OLP, oral mukozada en sık gözlenen dermatoz olup, vakalarda nadiren de olsa maligniteye dönüşme riski taşımaktadır. OLP lezyonların malign transformasyon riski açıklığa kavuşmamıştır. Yapılan çalışmalarda OLP'nin malign transformasyon riskinin %0,4 ile %5 arasında olduğu ve 6 aydan 20 yıla kadar geçen sürede değiştiği tahmin edilmektedir (37). Lezyon çoğunlukla yanak mukozası, dil, diş eti ve dudaklarda meydana gelmektedir. OLP oral kaviteyi etkileyen tüm beyaz lezyonların %9'unu oluşturmaktadır (1).

OLP ile benzer klinik ve histopatolojik özelliklere sahip bazı lezyonlar oral likenoid lezyon (OLL) olarak adlandırılmaktadır. OLL, gıda ve aroma verici maddelerin tüketimi ve sistemik ilaçların veya dental restoratiflerin kullanımı gibi farklı

etiyojilerle ortaya çıkar. Deri için yaş ortalaması 40-50 iken, oral hastalıklardan olan OLP ve OLL'de yaş ortalaması 50-60'tır (38).

WHO, 1978 yılında prekanseröz lezyonların klinik ve histopatolojik olarak gerçek tanısını belirlemek için bir çalışma yapmıştır (Tablo 2-2) (39). WHO tanımına dayanarak OLP'nin klinik ve histopatolojik değerlendirmesi oldukça subjektif ve yetersiz görülmüştür. Bu nedenle, Van der Meiji ve ark. tarafından, 2003 yılında WHO'ya dayalı OLP ve OLL'nin tanı kriterleri, klinik ve histopatolojik değerlendirilmelerin ışığında yeniden tanımlanmıştır (Tablo 2-3) (38, 39, 40).

Tablo 2-2: WHO'nun OLP için 1978'de yapmış olduğu tanı kriterleri

Kumar S Hiremath S (39)'den

Klinik Kriterler • Retiküler ve halka şeklinde beyaz papül, plak tipi lezyonlar, papülden yayılan grimsi beyaz çizgilerin varlığı. • Hafifçe kabarık grimsi beyaz çizgilerin dantel gibi ağımsı görünümü (Retiküler form) • Erezyon olmuş veya olmamış, atrofik lezyonun varlığı, aynı zamanda bülloz olabilir.
Histopatolojik Kriterler • Normal keratinize olmuş bölgenin orto veya parakeratanize tabakasının kalınlaşmasının varlığı, ya da normal keratinize olmamış bu tabakanın incelmesi olabilir. • Bağ dokunun epitel ve yüzeysel kısımlarını oluşturan bazal tabakadaki Ciavatte cisimlerinin varlığı. • Bağ dokusunun üstünde lenfositlerde oluşmuş, sınırları belirgin bant şeklinde hücresel infiltrasyon varlığı. • Bazal hücre tabakasında sıvılaşma dejenerasyonunun (liquefaction) işaretidir.

Tablo 2-3: 2003 yılında WHO tarafından düzenlenmiş OLL ve OLP'nin tanı kriterleri

Van de Meij E.H. (40)'den

Klinik Kriterler • Bilateral, az ya da çok sayıda simetrik lezyon varlığı. • Hafifçe kabarık gri-beyaz çizgilerin dantel gibi ağımsı yapısı (Retiküler model) • Eroziv, atrofiik, bülloz ve plak tip lezyonlar sadece oral mukozadan başka bir yerde, retiküler lezyonların varlığında alt tip olarak kabul edilirler. • Yukarıda geçen kriterlerin tamamı hariç, OLP benzeri diğer tüm lezyonlar için 'klinik ile uyumlu' terimi kullanılmalıdır.
Histopatolojik Kriterler • Bağ dokusunun üstünde lenfositlerde oluşmuş, sınırları belirgin bant şeklinde hücrel infiltrasyon varlığı. • Bazal hücre tabakasının sıvılaşma dejenerasyonu. • Epitel displazinin olmaması • Histopatolojik özelliklerin daha az belirgin olması durumunda, 'histopatolojik olarak uyumlu' terimi kullanılmalıdır.
OLP veya OLL kesin tanısı Kesin tanıyı belirlemek için, klinik özelliklerle birlikte histopatolojik özelliklerin de dahil edilmesi gerekmektedir. • OLP- OLP'nin tanısı için hem klinik hem de histopatolojik kriterlerin yerine getirilmesi gerekmektedir. • OLL- OLL terimi aşağıdaki koşullar altında kullanılmalıdır. 1) Klinik olarak OLP özelliği taşıyan, ancak yalnızca histopatolojik olarak OLP 'ile uyumlu' olması. 2) Histopatolojik olarak OLP özelliği taşıyan, ancak yalnızca klinik olarak OLP 'ile uyumlu' olması. 3) Klinik özellik olarak OLP 'ile uyumlu' ve histopatolojik özellik olarak OLP 'ile uyumlu' olması.

2.3.2.4.1. OLP'nin Epidemiyolojisi

OLP genel populasyonun %1- 2'sinde görülen, etiyolojisi tam olarak bilinmeyen kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Yetişkinlerde yapılan çalışmaların çoğunda, OLP'nin kadınlarda erkeklerden yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Gözlenen vakalarda yaş aralığı en fazla 40-60 yaştrı (4). Genel olarak, OLP'nin prevelansı coğrafi bölgelere göre değişiklik göstermektedir. OLP, Japon popülasyonunda %0,5, İsveç popülasyonunda %1,9, Malezya popülasyonunda %0,38 ve Hindistan popülasyonunda %2,6 ile en yüksek prevelansla gözlenmektedir (41).

Çocuklarda gözlenen liken planus belirsizdir, toplam hastaların %1 ile %4'ünü oluşturmaktadır. Çocuklarda nadir olmakla birlikte, en genç belgelenen vaka 3 aylıktır. Yapılan araştırmalara göre, ırklar arasında bir farklılık olmasa da, en büyük olgu grupları, Hindistan yarımadasından olduğu belirtilmiştir. Çocuk vakalarda görülen OLP'nin Hindistan popülasyonunda yüksek prevelans göstermesinin sebebinin, çevresel etkiler ve/ veya genetik yatkınlığın olduğu düşünülmektedir (1, 42).

2.3.2.4.2. OLP'nin Histopatolojisi

OLP'nin histolojisi; epitel hücreleri arasındaki lenfositlerin sayıca artışı ve bazal keratinositlerin dejenerasyonu ile gelişen yoğun subepitelyal lenfositik infiltrasyon ile karakterize edilir. Dejenere olmuş bazal keratinositler, homojen eozinofilik globüller gibi gözüken kolloid cisimleri (civatte, hiyalin, sitoid) oluşturlar (43). Kolloid cisimlerin ultrastrukturleri, kullanılan end labeling yöntemiyle incelendiğinde, hücre içerisinde DNA parçaları ve apoptotik keratinositlerin olduğu gösterilmiştir. OLP'de epitelin bazal membranı boyunca değişimler yaygın olmakla beraber, boşluk, dallar ve duplikasyonlar da içermektedir. Buna ek olarak, bazal keratinositlerin tutunma elemanları (hemidezmozomlar, filamentler ve fibriller) bozulmaktadır. Bazal keratinositlerin dejenerasyonu ve epitel bazal membranının bozulması ile epitel bağ doku arayüzeyinde bazal keratinositlerin tutunma elemanlarının zayıf üretilmesi histolojik yarık oluşumuna ve oral mukozada klinik olarak saptanabilen kabarıklara neden olabilir. Parakeratoz, akantoz ve 'testere diş' rete peg oluşumu gözükebilir (44).

OLP'nin histolojik özellikleri, ilk olarak 1906'da Dubreuill tarafından tanımlanmıştır, daha sonra Shklar tarafından geliştirilmiştir (45). OLP ile kutanöz liken

planus, bölgesel parakeratozis, akontozis, granuler hücre tabakasının kalınlaşması, bazal hücre tabakasının sıvılaşma dejenerasyonu ve körleşmiş rete çıkıntıları özellikleri birbirine benzerdir. Deri lezyonlarında bulunan rete çıkıntıları ‘testere diş’ görünümüne sahiptir. Shklar, oral liken planus için üç tane klasik mikroskopik özellik tanımlamıştır. Bu özellikler, oral liken planusun üzerini örter şekilde keratinizasyon varlığı, bağ dokunun temelinde kronik inflamatuvar hücrelerin bant gibi tabakalanması ve bazal hücre tabakasında sıvılaşma dejenerasyonudur. Hastalığın erken tanısında, Langerhans hücreleri ve Civaatte’nin poikilodemasına benzer cisimciklerin bazal tabakada varlığı ve bazal tabanın altına yoğun lenfositik infiltrasyon bantlarının görülmesidir. Bunu bazal tabakanın sıvılaşma dejenerasyonu ve bazal membranın altında eozinofilik materyallerden ince bir bandın izlemesidir. Kolloid cisimcikler, hiyalin veya Civatte cisimcikleri olarak da adlandırılmaktadırlar ve bağ dokunun üst tabakasında ya da epitelin alt tabakasında olduğu görülebilir. Bunlar yuvarlak, eozinofilik globüllüdürler. Bu cisimcikler, muhtemelen makrofajlar tarafından fagosit edilen epitel hücreleri ve dejenere epitel kalıntıları içerirler. Direkt immunofluoresan yöntemi, bu cisimciklerin IgA, IgG, ve IgM’lerini boyar (44).

2.3.2.4.3. Patogenez

OLP lezyonların patogenezinde, çok sayıda immunolojik mekanizma, özellikle hücresel immunitenin rolü olduğu belirtilmiştir. OLP’nin immunpatogenezi için farklı hipotezler bulunmaktadır. Bunlar; antijene spesifik hücreler tarafından oluşturulan immun cevap, otoimmunité cevabı, humoral immunité ve antijene spesifik olmayan mekanizmalardır. Antijene spesifik hücreler tarafından oluşturulan immun cevaba göre, LP lezyonlarındaki lenfositik infiltrasyon başlıca CD4+ ve CD8+ lenfositlerinden oluşan T hücreleriyle meydana gelir. LP lezyonlarında, sitotoksik CD8+ lenfositlerin bağlandığı bazal keratinositlerde dejenerasyon gözlenmiştir. Bu lenfosit infiltrasyonu, epidermis içinde ve hasar görmüş bazal keratinositlere yakın bölgelerde görülür. Lezyonun ilerlemesiyle de lenfositik infiltrasyon alanlarında artış gözlenmektedir. Otoimmun cevapta ise, otoimmunitéyle ilgili pek çok hastalıkta, immunsupresif aktivitenin arttığı durumlarda, OLP lezyonlarında otositotoksik T hücreleri görülmüştür. Bir diğer hipotez olan humoral immunitéye göre, OLP lezyonlarında, kontrol gruplarına göre, SMA (anti-smooth muscle actin)’ların belirgin derece yükseldiği bildirilmiştir. Spesifik olmayan mekanizmalar arasında, epitelin bazal membranı, metalloproteinaz

matriksin, kemokinlerin, mast hücrelerin, VEGF'nin (vasküler endotelial büyüme faktörü), dental dendrisitlerin ve Langerhans hücrelerin rolü bulunmaktadır (38).

2.3.2.4.4. Etiyoloji

OLP'nin etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, liken planus için otoimmünite, immun yetmezliği, stress, genetik yatkınlılar, alkol ve tütün kullanımı, gıda alerjileri, ilaç, tramva, bakteri, virüs, diyabet ve hipertansiyon etyolojik faktörlerden bazıları olarak kabul edilmektedir (6, 38).

2.3.2.4.4.1. Dental Restoratif Materyaller

Dental restoratif materyallerin, (amalgam, kobalt, altın ve kompozit dolgu gibi maddeleri içermektedir) OLP'ye sebep olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda amalgamın gerçekten de OLP'nin etiopatogenezinde tetikleyici faktör olduğu görülmüştür. Bazı araştırmacılar, civa duyarlılığı (amalgam alaşımının ana bileşeni) önemli bir neden olduğunu öne sürmüşlerdir ve bu lezyonlar, civaya karşı aşırı duyarlı, gecikmiş bir cevabı temsil edebilirler (46).

2.3.2.4.4.2. İlaçlar

OLP indükleyici ilaçlar, non-steroid anti-inflamatuar maddeler ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleridir. İlacın bırakılması ve yeniden başlanması, lezyonun rezolüsyonu veya reaktivasyonunun teşhisi için en güvenilir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada, non-steroid antiinflamatuar ajanların LP'ye sebep olması düşünülmekle birlikte, beta-bloker, metildopa, penisilamin, kinidin ve kinin de LP'de önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Diğer ilaçların büyük bir kısmı da OLP ile ilişkilendirilmiştir (46).

2.3.2.4.4.3. Psikolojik Durum

Psikolojik profil OLP'li hastalar için oldukça önemli olduğu belirtilmektedir. Yüksek düzeyde anksiyete varlığı, ağır depresyon geçiren hastalarla ve kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmalarda oral LP'da psişik bozuklukların artmış olduğu gözlenmektedir. Özellikle stresin OLP için önemli bir etyolojik faktör olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle oral liken planus olgularının akut alevlenmesinin en önemli nedenlerinden biri stres varlığı olarak kabul edilmektedir (46, 47).

2.3.2.4.4.4. Enfeksiyon ajanları

OLP ile ilgili ilişkili olduğu düşünülen virüsler iki gruba ayrılır. İlk gruba dahil olan virüsler içerisinde, Varisella Zoster virüsü (suçiçeği), Epstein-Barr virusü (EBV), Sitomegalovirus (CMV), Herpes virusu (HSV), Human Papilloma virüsü (HPV) ve insan bağışıklık yetmezliği virusü, (HIV) gibi virüsler bulunmaktadır. İkinci gruba dahil olan virüsler ise, LP ile ilişkisi olduğu düşünülen Hepatit C (HCV) virüslerini kapsamaktadır. OLP ile en fazla HCV virüsü çalışılmış olmasına rağmen, OLP ile ilişkisi tartışmalıdır. OLP olgularının mukozal lezyonlarında HCV RNA'nın bulunması ve OLP lezyonlarında, HCV spesifik CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin varlığı, OLP'nin immunopatogenezinde HCV antijenlerini eksprese eden epitel hücrelerinin rol oynadığını düşündürmektedir. Bir başka bakış açısında, HCV enfeksiyonu için, interferon-alfa veya interferon alfa/ribavirin gibi antiviral tedavilerde OLP'nin indüklenebileceği ve/veya şiddetlenebileceğidir (48). İki hastalık arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar, genetik, çevresel, coğrafik ve diğer faktörlere bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Japon ve Akdeniz toplumlarında bağlantı/birlikteliğin güçlü olması, HVC enfeksiyonun prevelansının bu gruplarda daha yüksek olmasına bağlanmaktadır (38).

Japonya'da; Nagao ve Sata'nın 59 OLP'li olgu ile yaptıkları çalışmada HCV prevelansı %67,8 (49), Tayvan'da; Chung ve ark. 32 OLP'li olgu ile yaptıkları çalışmada HCV prevelansı %43,7 (50), Pakistan'da; Mahboob ve ark. 184 OLP'li olgu ile yaptıkları çalışmada HCV prevelansı %23,3 olduğu belirtilmiştir (51). Türkiye'de ise OLP'li olgularda HCV prevelansı sırasıyla, Erkek ve ark. 54 olguda %12,2 (52), Kirtak ve ark. 73 olguda %6,8 (53), Denli ve ark. 140 olguda %5 (54), Harman ve ark. 128 olguda %6,2 (55) ve Karavelioğlu ve ark. 41 olguda %4,8'dir (56, 57).

2.3.2.4.4.5. Sistemik Hastalıklar

Grinspan'ın yapmış olduğu araştırmada, OLP'nin, diabetes mellitus ve hipertansiyon hastalıklarıyla olan ilişkisini öne sürmüşlerdir. Bu çalışma sonucunda OLP'nin diabetes mellitus ve hipertansiyon ile ilişkisi Grinspan's sendromu olarak adlandırılmıştır (58). Yapılan çalışmalarda ise, sendromun söz konusu olmadığı, ancak diabetli ve hipertansiyon hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlara bağlı olarak gelişen bir likenoid ilaç reaksiyonu olabileceği belirtilmiştir (59, 60).

Liken planus, ülseratif kolit, alopesi areta, vitiligo, miyastenia gravis, kronik aktif hepatit, primer biliyer siroz, timoma ve Sjögren sendrom (SLE) gibi çeşitli sistemik otoimmün hastalıklar ile birlikte görülebilir (60). Yapılan çalışmalarda, OLP ile Haşimato tiroidi (HT) ve hipotiroidi gibi tiroid hastalıkları arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmüştür (61).

2.3.2.4.4.6. Tütün ve Alkol Kullanımı

Dünya genelinde tütün kullanımının yaygınlığı, sağlık için en önemli risk faktörlerinden biridir. Dünyada yaklaşık olarak yetişkin popülasyonun 1/3'ü tütün ve tütünün farklı formlarını kullanmaktadır. Tütün genellikle sigara şeklinde kullanılsa da pipo, puro, nargile, ters sigara içimi ve tütün çiğneme (betel quid, areca nut) gibi farklı kullanımları bulunmaktadır. WHO'nun 2002 yılında yayınladığı rapora göre, 2000 yılında 4,9 milyon kişi nikotin bağımlılığından dolayı ölmüştür. Sigara içme prevalansı yüksek gelirli ülkelerde azalmasına rağmen, birçok düşük ve orta gelirli ülkelerde hızla artmakta olduğu bildirilmiştir. Tütün; ağız kanseri, ağız kanser nüksü, yetişkin peridontal hastalıklar ve hamilelik sırasında sigara içimine bağlı olarak çocukta gelişen yarı damak ve dudak gibi konjenital defektler için önemli risk faktörüdür. Tütün kullanımı, oral enfeksiyonlara karşı immün sistemin cevabını baskılamaktadır. Tütün kullanımıyla birlikte tüketilen alkol veya areca nut kullanımı riski daha da arttırmaktadır (62, 63).

Daftary ve ark., Hindistan popülasyonunda, oral kanser ve prekanseröz lezyonun bir epidemiyolojik çalışması esnasına, betel quid çiğneyenlerde OLP benzeri lezyonları rapor etmişlerdir. Bu OLP benzeri lezyonlar, kazıyarak çıkarılamayan, beyaz, linear, dalgalı, paralel, yüksek olmayan şeritlerden oluşmaktadır. Bazı örnek lezyonlar da bir eritamatöz merkezden yayılmaktadır. Bununla birlikte, ince beyaz şeritler, üst üste gelmemektedir veya klasik OLP'de olduğu gibi çapraz çizgilidir. Lezyon genellikle betel quid/ çiğnenen tütünün olduğu bölgede meydana gelmektedir (41, 64). Zain ve ark. yaptıkları çalışmada OLP benzeri lezyonları 'betel-quid likenoid lezyonu' olarak tanımlamayı öne sürmüşlerdir. OLP'de betel quid için rastlantısal bir rol tanımlanmamıştır (41, 65).

OLP'de tütün kullanımı, içindeki kimyasalların değişimi, nötrofillerin fagositozu gibi mekanizmalar ve iritasyon sayesinde doku tahribatına sebep olmaktadır. Sigara içen kişilerde oral kansere yakalanma riski, sigara içmeyenlere göre 2 ile 5 kat daha fazladır.

Bazı araştırmacılar, tütün karsinojenine maruz kalan atrofik mukozada, OLP'den kanser gelişimi gözlenebileceğini öne sürmüşlerdir (66). Yapılan çalışmalarda sigara ile OLP ilişkisi tartışmalıdır. Neumann- Jensen ve ark. yapmış oldukları çalışmada, OLP lezyonlarında, sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre daha az olduğunu bulmuşlardır. (67) Gorsky ve ark. yapmış oldukları çalışmada ise, sigara ve OLP'nin farklı klinik belirtileri arasında bir ilişki olabileceğini öne sürmüşlerdir (68).

Alkol tüketimi, oral kanserin gelişiminde en önemli değiştirilebilir risk faktörlerinden biridir. Alkollü içeceklerin aşırı tüketimi, kronik hastalıklar, Alzheimer hastalığı, felç, karaciğer hastalığı, kronik solunum hastalığı, diabetes mellitus, kemik iliği hastalığı ve diğer kanserlerin gelişimde risk faktörüdür. Oral karsinogenez için, sigara ve alkol tüketimi sinerjik risk faktörleridir. Buna ek olarak, gelişmiş ülkelerde tütün kullanımı ile tüketilen alkol, gözlenen oral kanserlerin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır (69).

Ethanol tüketimi, oral kanser gelişiminde hem lokalizasyon hem de sistemik bir risk faktörü gibi davranmaktadır. Lokal olarak etki mekanizmalarında, ethanol ve mukoza penetrabilitesi, mukoza morfolojisi, asetaldehit tarafından oluşan hücresel hasar, genotoksisite ve tükürük salgısının azalması bulunmaktadır. Sistemik olarak etki mekanizmalarında ise, toksik maddelerin karaciğerde anormal metabolizasyonu, immunsupresyon ve kötü beslenme bulunmaktadır (69).

Ağız gargaralarının, oral enfeksiyon tedavilerinden ağız kokusuna kadar farklı kullanım alanları bulunmaktadır. Ticari olarak satılan ağız gargaralarında, %6 ile %29,9 arasında değişen konsantrasyonla ethanol bulunmaktadır. Bazı araştırmacılara göre, alkol içeren ağız gargaraların oral kanser için risk faktörü olduğu öne sürülmüştür. Ancak alkol içeren ağız gargarası ile oral epitelyal displazi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmada, gargara kullanımının lezyon gelişimiyle bir ilişkisi bulunamamıştır (70).

2.3.2.4.5. OLP'nin Klinik Tipleri

OLP, oral mukozada belirgin bir klinik görünüm sergileyen ve karakteristik yerleşim gösteren bir lezyondur. Klinik olarak; retiküler, atrofik (erimatöz) ve eroziv (ülseratif, büllöz) olarak üç tipte sınıflandırılmaktadır (71, 72).

2.3.2.4.5.1. Retiküler Tip OLP

Retiküler OLP genellikle asemptomatiktir ve çoğunlukla muayene sırasında tesadüfen saptanır. Karakteristik retiküler lezyonlar en sık yanak mukozasında gözlenmektedir. Dantel gibi desen oluşturan papüller veya kabarık beyaz çizgiler şeklinde olup, bilateral ve ince simetrikler. Retiküler OLP eritamatöz veya noneritamatöz olabilir ve halkasal bir şekilde görünebilir (73). Retiküler form, Wickham's çizgileri olarak bilinen beyaz çizgilerden oluşur ve OLP'nin en yaygın tipidir (74). Bu çizgiler genellikle yanak mukozasında, mukoyanak katmanda, diş etinde ve daha az sıklıkta dil, damak ve dudak üzerinde bilateral olarak yer almaktadır. Klinik olarak lökoplakiye benzeyen fakat multifokal dağılımı olan retiküler OLP'nin bir varyantı, plak benzeri forma sahiptir. Bu plak benzeri lezyonların görünümü pürüzsüz düz alanlardan, düzensiz yüksek alanlardan oluşur. Bu varyant yaygın olarak dilin dorsalinde ve yanak mukozasında bulunur. Hem retiküler form hem de plak benzeri varyant genellikle asemptomatiktir (75).

2.3.2.4.5.2. Atrofik (Eritamatöz) Tip OLP

Atrofik tip, kırmızı lezyonlar halinde görülmektedir (74). Atrofik tip eroziv OLP'nin varyantı olarak da görülmektedir. Atrofik form, dağınık, ince beyaz çizgilerle sarılı eritamatöz parçalar halinde görülebilir. Bu formun, semptomatik belirtileri olabilir (75).

2.3.2.4.5.3. Eroziv (Ülseratif, Büllöz) Tip OLP

Eroziv OLP lezyonları, yoğun eritamatöz mukoza yüzeylerinde beyazımsı pseudomembranlı düzensiz ülseratif geniş alanlar olarak bulunmaktadır. Bazı lezyonlar atrofik veya ilişkili mukozaların birleşme noktasında radyal beyaz ince çizgi halinde görülebilir. Eroziv lezyonlar genellikle ağrılıdır ve gıdalar veya dental hijyen ürünleriyle tahrişe maruz kalmıştır (73).

Eroziv OLP, ikinci en sık görülen tipidir. Eroziv OLP, ince radyal keratotik çizgilerle sarılı eritamatöz ve ülserli bölgelerin bir karışımı olarak bulunmaktadır. Eroziv OLP yapışık gingival dokuda görüldüğü zaman, "deskuamatif gingivitis" olarak adlandırılır. Eroziv OLP lezyonları zamanla yayılarak, multifokal olma eğilimindedirler. OLP'nin bu formuna yakalanan hastalar da, şiddetli ağrılı semptomlar belirtir ve normal çiğneme fonksiyonlarını gerçekleştiremezler (75).

2.3.2.4.6. OLP'nin Ekstraoral Tutulumu

OLP genel olarak oral mukozayı etkilemesine rağmen, bazı olgularda deri, saç derisi, tırnak, penis, vulvar, vajina ve nadir de olsa göz, özofagus gibi diğer vücut bölgelerinde de gözlemlenir. OLP'li olgularda gözlenen deri lezyonlarıyla yapılan çalışmalarda bu oran %4 ile %44 arasında değişkenlik gösterir. Deri lezyonlarında, karakteristik olarak morumsu renkte olan eritamatöz, düz çıkıntılı, iltihaplı, çok köşeli papüllü yüzeyleriyle Wickham's çizgileri gözülür. Bu lezyonlar, kollar, bilekler, ayak bilekleri ve genital bölgenin fleksör yüzeylerinde etkilidir (1, 33,76).

Deri LP, OLP'nin yaklaşık %15'yle birlikte görülürken, genital LP, OLP'nin yaklaşık %20'siyle birlikte görülmektedir. Pelisse tarafından tanımlanan, "vulvovaginal-gingival sendromu"; liken planusun vagina, vulva ve gingivada birlikte görülmesidir (76, 77).

2.3.2.4.7. OLP nin Tedavisi ve Prognozu

Retiküler tip LP, genellikle semptom göstermemektedir ve tedaviye ihtiyaç duymamaktadır. Ancak bazı olgularda, *Candidiasis* ile birlikte görülmesi, olguların ağız mukozalarında yanma hissinin oluşmasına sebep olur. Bu olguların tedavilerinde, antifungal tedavi gerekli görülmektedir. Bazı araştırmacılar, OLP'de gözlenen retiküler lezyonlara sahip olguların, yıl içersinde tekrar değerlendirilmesini önermektedir (78).

Eroziv LP, olguların ağızında rahatsız edici şekilde açık yaralara sebep olmaktadır. Bu olguların tedavilerinde, kortikosteroidler tavsiye edilmektedir. Bu lezyon, sistemik kortikosteroidlere tepki vermektedir, ancak bazı güçlü tedaviler genellikle gerekli görülmemektedir. Tedavi için uygun olan, güçlü topikal kortikosteroidlerden biriyle (fluocinonide, betamethasone, clobetasol jel gibi) 1 ile 2 hafta arasında sonuç alınmaya kadar, semptomatik bölgeye günde bir kaç defa uygulanır. Bazı araştırmacılar, yapıştırıcı metilselüloz baz ile kortikosteroid merhemlerin birleştirilmesini tavsiye etmektedir, ancak hastalar bu materyalin uygulanmasının zorluğu sebebiyle bu iki materyalin uyumluluğunu azaltabilmektedirler. Bu hastalar, yanma hissinin tekrar oluşması durumunda, kortikosteroidleri yeniden uygulamaları gerektiği konusunda uyarılmalıdır. Ayrıca, iyatrojenik *Candidiasis*'in kortikosteroid kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tedaviye cevap vermeyen eroziv LP'li olgular, takrolimus veya siklosporin gibi, topikal retinoid ajanlar kullanılarak, tedavileri zaman zaman desteklenmektedir. Ancak siklosporin kullanan olgularda, bu retinoid

ajanın yan etkileri belirgin bir şekilde ortaya çıkabildiği gibi, olgular için ilaç fiyatı da oldukça yüksek olabilir. Bazı araştırmacılar, özellikle lezyonun tipik olmadığı durumlar ve eroziv OLP'li olgular için her 3 ile 6 aylık süre icersinde tekrar değerlendirme yapılmasını önermektedirler (78).

LP'nin, özellikle eroziv tip OLP'nin potansiyel malign durumunun kesinliği henüz açıklanmamıştır. Çoğu olgunun malign dönüşümü raporlanmıştır, ancak bunlar daha ziyade yetersiz belgelerdir. Çünkü raporlanan bazı olguların, kesin tanıli liken planus olmadığı, sekonder likenoid inflamuvur infiltrasyon gösteren ve liken planusa benzeyen "likenoid displazi" olduğu düşünülmektedir. Bu duruma göre, OLP ve YEHK'nın nadir olmadığı, bazı insanlarda bu iki hastalığın eş zamanlı olarak görülebildiği ve hastalık süreçlerinin de birbiri ile bağlantılı olmadığı düşünülmektedir. Bunun aksine, bazı araştırmacılar, liken planusun atrofik epitelinin karsinogeneze karşı daha hassas olduğunu belirtmişlerdir. Klasik retiküler liken planus olgularının moleküler özellikleri ile yapılan bir çalışmada, oral reaktif lezyonlar, normal oral mukoza, yassı epitel hücreli karsinom ve oral epitel displazinin çeşitli derecelerinin tümör baskılayıcı bölgelerindeki heterozigozite kaybı karşılaştırılmıştır. OLP'nin moleküler profili, normal veya oral reaktif mukozaya daha çok benzediği ve LP'nin prekanseröz olma kavramı için bulguların yetersiz olduğu belirtilmiştir. OLP ile "likenoid" lezyonların malign dönüşüm oranlarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise, araştırmacılar tipik LP olgularında malign dönüşümün saptanmadığını, ancak bazı likenoid lezyonların YEHK'ya dönüştüğünü belirtmişlerdir. Raporlanan olguların çoğu ya eroziv ya da plak tip olarak adlandırılan liken planus tipleri ile sınırlandırılmıştır (78).

2.3.2.4.8. OLP ile Malignite İlişkisi

WHO, OLP'yi, potansiyel malign bir hastalık olarak sınıflandırmıştır. OLP'nin prognozu ve ilerlemesi ile ilgili en önemli komplikasyonlardan biri de 10 ile 15 yıl içerisinde %0,5 ile %2,2 arasında malign transformasyon göstererek yassı epitel hücreli karsinoma dönüşmesidir (24). OLP'nin en sık rapor edilen atrofik ve eroziv tip olgularında, malign transformasyon oranının %1-12,5 arasında olduğu belirtilmektedir (30, 79, 80).

Genellikle çoğu olguda dilin lateral bölgesinde konumlanmış OLP'den YEHK'ya malign transformasyon bulunmaktadır. Ancak bazı literatürlerde YEHK için

nadir bir yer olarak kabul edilen, dilin dorsalinden OLP'nin plak tipinden kaynaklandığı belirtilmiştir. Sigara ve alkol kullanımı OLP'den YEHK oluşumu için kesin bir risk faktörü değildir. OLP'nin HCV ile ilişkilendirilen eroziv ve atrofik tiplerinde YEHK'ya doğru bir yönelim olduğu düşünülmektedir. İtalyan popülasyonlarındaki çalışmalarda, HCV enfeksiyonunun yüksek prevelansı sebebiyle transformasyon oranının da yükseldiği belirtilmektedir (48).

1972-2014 yılları arasında, OLP ile malign dönüşüm ilişkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, malign değişim yüzdeleri farklı oranlarda bulunmuştur (Tablo 2-4) (48). Lauritano ve ark., 2016 yılında 87 olgu ile yapmış oldukları çalışmada sadece 1 olgunun (%1,2) malign değişim gösterdiğini saptamışlardır (81).

Tablo 2-4: 1972- 2014 yılları arasında OLP ile malign değişim ilişkisi

Shirasuna K. (48)'den

Referanslar	Yıl	Ülke	Olgu Sayısı	MalignDeğişim Olgularının Sayısı(%)	İzlem Süresi (Yıl)
Shklar	1972	Amerika	600	3 (%0,5)	
Fulling	1973	Danimarka	225	1 (%0,4)	3,6
Kovesive Banoczy	1973	Macaristan	274	1 (%0,4)	
Silverman ve ark,	1985	Amerika	570	7 (%1,2)	5,6
Murti ve ark.	1986	Hindistan	702	3 (%0,4)	5,1
Holmstrup ve ark.	1988	Danimarka	611	9 (%1,5)	7,5
Salem	1989	Suidi Arabistan	72	4 (%5,6)	3,2
Silverman ve ark.	1991	Amerika	214	5 (%2,3)	7,5
Sigurgeirsson ve ark.	1991	İsveç	2071	8 (%0,4)	9,9
Voute ve ark.	1992	Hollanda	113	3 (%2,7)	7,8
Barnard ve ark.	1993	İngiltere	241	8 (%3,3)	
Moncarz ve ark.	1993	İsrail	280	6 (%2,1)	1,5
Gorsky ve ark.	1996	İsrail	157	2 (%1,3)	4,8
Markopoulos ve ark.	1997	Yunanistan	326	4 (%1,3)	6,1
Silverman ve ark.	1997	Amerika	95	3 (%3,2)	5,7

Lo Muizo ve ark.	1998	İtalya	263	13 (%4,9)	11,0
Rajentheran ve ark.	1999	İngiltere	832	7 (%0,8)	6,0
Mignogna ve ark.	2001	İtalya	502	18 (%3,7)	
Chainani-Wu ve ark.	2001	Amerika	229	4 (%1,7)	4,5
Eisen	2002	Amerika	723	6 (%0,8)	
Lanfranchi ve ark.	2003	Arjantin	719	32 (%4,5)	4,9
Gandolfo ve ark.	2004	İtalya	402	9 (%2,2) HCV ile enfekte	6,8
Rödström ve ark.	2004	İsveç	1028	5 (%0,5)	
Xue ve ark.	2005	Çin	674	4 (%0,6)	4,3
Laijendecker ve ark.	2005	Hollanda	200	3 (%1,5)	
Bornstein ve ark.	2006	İsveç	145	1 OLP, 3 OLL	
Ingafou ve ark.	2006	İngiltere	690	13 (%1,9)	8,5
Van der Meij ve ark.	2007	Hollanda	67,(OLP)	0 (%0) (OLP)	10,2
			192, (OLL)	4 (%2) (OLL)	
Carbone ve ark.	2009	İtalya	808	15 (%1,85)	
Pakfetrat ve ark.	2009	İran	420	3 (OLL?) hafif displazi	
Bemejo-Fenoll ve ark.	2010	İspanya	550	8 (%0,9)	
Bombeccari ve ark.	2011	İtalya	327	8 (%2,4)	
Shen ve ark.	2012	Çin	518	5 (%0,96)	
Tovaru ve ark.	2013	Romanya	633	6 (%0,95)	
Gumru ve ark.	2013	Türkiye	370	1(%0,27) 2yılsonra gelişmiş	

2.4. ORAL MUKOZA KARSİNOMLARI

Oral kanserler içinde, en sık görülen yassı epitel hücreli karsinomlardır (YEHK) ve tüm oral kanserlerin yaklaşık %90'nını oluşturur. YEHK grubunda, kovansiyonel yassı epitel hücreli karsinom, verrüköz karsinom, spindle hücreli karsinomlar, bazoloid karsinom, adenoskuamöz hücreli karsinom, papiller skuamöz hücreli karsinom, adenoid skuamöz hücreli karsinom bulunmaktadır. Oral kavitede daha az sıklıkla görülen

karsinomlar ise, tükürük bezi karsinomları, lenfomalar, sarkomlar, metastatik tümörler, multiple myelom ve melanomlardır (82, 83, 84).

Oral kavitede en sık gözlenen malign tümör olan YEHK'nın, oral kavitedeki lokalizasyonu genellikle dil, dudak, gingiva, sert damak, yumuşak damak, ağız zemini ve yanak mukozasıdır. Klinik olarak, YEHK kırmızı lezyon, beyaz lezyon, ülserli tümör kitlesi veya başka varyasyon ya da renkte olabilmektedir (83). YEHK, dünya popülasyonunda, erkeklerde en sık gözlenen kanser sıralamasında 6. sırada olmasına rağmen, kadınlarda bu sıralama daha nadir olarak belirtilmiştir. YEHK'nın insidans ve mortalite oranları, farklı popülasyonlarda çeşitlilik gösterirken, genellikle gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda, Hindistan, Pakistan, Tayvan ve Macaristan'da yüksek insidans ve düşük sağ kalım oranları rapor edilmiştir (85). YEHK etiyojisinde, genetik faktörler (metabolizma, DNA tamir mekanizması ve immunité) önemli bir rol oynamakla birlikte, çevresel faktörler (kimyasal ve fiziksel) de hastalığın başlıca tetikleyici risk faktörleri arasındadır. Ayrıca bunlara ek olarak, yaşam tarzı alışkanlıkları (sigara kullanımı, tütün çiğnenmesi, alkol tüketimi, mikroorganizmalar) da önemli risk faktörleridir. YEHK'nın, klinik olarak premalign lezyonlardan veya prekanseröz olarak tanımlanan lezyonlardan maligniteye dönüştüğü yapılan çalışmalar ile de belgelenmiştir (86, 87).

Karsinogenezin temelinde, çevresel maruziyet sonucu somatik hücre içinde öldürücü olmayan mutasyona neden olan genetik hasar bulunmaktadır. YEHK'nın oluşumu; genetik, epigenetik değişiklikler, heterozigote kaybı, metilasyon ile gen inaktivasyonu, gen amplifikasyon ve nokta mutasyonu gibi mekanizmalarla çok aşamalı bir şekilde gerçekleşmektedir. Ayrıca YEHK olgularında sayısal anomaliler yanı sıra dengeli-dengesiz translokasyon, delesyon, disentrik kromozomlar ve gen amplifikasyonları gibi yapısal kromozom anomalileri de bulunmaktadır (88, 89). Yapılan çalışmalarda, YEHK'nın 3p, 4q, 5q21-22, 8p21-23, 9p21-22, 11q13, 11q23, 13q, 14q, 17p, 18q ve 22q kromozom bölgelerinde delesyon, 1q, 3q, 5p, 7q, 8q, 9q, 11q, 12p, 14q ve 15q kromozom bölgelerinde ise artışlar bulunmuştur (90). Bu kromozom anomalileri, p16 (9p21), APC (5q21-22) ve p53 (17p13) gibi önemli tümör baskılayıcı genlerin işlevini ve ekspresyonunu etkilemektedir. (85). Kasamatsu ve ark. yapmış oldukları çalışmada, YEHK'lı olguların %53'ünde CDKN2A'nın heterozigote kaybı ve 50 olguluk YEHK'lı 2 olguda (%4) da anlamsız mutasyon bulmuştur (89).

YEHK yayılma ve metastaz yapma yeteneğindedir. Ancak bu değişimlere rağmen oral kanserler, WHO tanımlamasında, risk grubundaki etkenlerin (alkol, tütün gibi) ortadan kaldırılması halinde ‘önlenebilir kanser’ grubundadır (8, 91).

2.5. KARSİNOGENEZ

Genetik hasarın asıl hedefinde, büyümeyi uyaran protoonkogenler (onkogenlerin normal hücresel formu), büyümeyi inhibe eden tümör baskılayıcı genler (TBG) ve programlı hücre ölümünü (apoptozisi) ve DNA tamir mekanizmasını düzenleyen genler vardır (10).

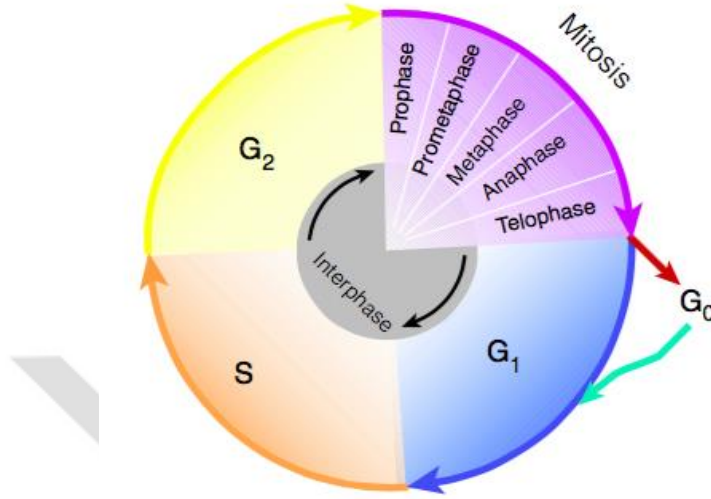
Protoonkogenler normal hücrelerin büyümesi, çoğalması ve farklılaşması gibi önemli işlevlerden sorumlu olan genleridir. Onkogenler ise, hücrenin normal büyüme ve farklılaşmasını destekleyen protoonkogenlerin herhangi bir nedenle mutasyona uğraması ya da başka nedenlerle yeni bir işlev kazanması ile değişikliğe uğramış halidir. TBG ise, hücre bölünmesini denetlemektedir. Normal hücrede çoğalmanın kontrolü için gerekli olan TBG’ler, hasara uğradıkları zaman hücrenin denetimsiz çoğalmasına sebep olmaktadır (92). Protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar tümör gelişimine, TBG’de meydana gelen mutasyonlar ise, anormal hücre büyümesine neden olur. Hücre büyümesi ve ölüm arasındaki dengenin bozulması hiperplazi veya neoplaziye neden olur. Pozitif veya negatif uyaranlar genetik lezyona yatkın hücrelerde, malign çoğalmaya neden olabilir (10).

Onkogenlerin aktivasyonu ve TBG inaktivasyonları, hücrenin kontrolsüz çoğalması, kontak inhibisyonun kaybolması, invazyon ve metastaz yeteneği kazanması gibi malign özellikler kazanmasına yol açar (93).

2.6. HÜCRE SİKLUSU

Dış uyarılar sonucu biyokimyasal olarak başlatılan bir dizi fazdan geçen hücreler, dış ve iç büyüme faktörleri tarafından kontrol edilerek birbirinin tam benzeri iki yavru hücreye bölünürler. İnsan vücudundaki hücrelerin büyük çoğunluğu G₀ olarak adlandırılan, istirahat evresinde bulunmaktadır. Hücre siklusu; DNA sentezi için gerekli hazırlıkların yapıldığı G₁ (presentetik büyüme fazı) evresi, DNA sentezinin yapıldığı S evresi, DNA sentezinin durduğu ancak mitoz evresi için gerekli hazırlıkların yapıldığı G₂ (premitotik büyüme fazı) evresi ve bunu takiben mitoz bölünmenin gerçekleştiği M evresi şeklinde 4 evreden oluşmaktadır. İnterfaz (G₁, S ve G₂)

evresinden sonra gerçekleşen mitoz fazı ise, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2-1) (94, 95).



Şekil 2-1: Hücre siklusu

Lents N.H. (95)'den

Hücre siklusunda G_1 -S, G_2 -M geçişi ve M evresi esnasında önemli kontrol noktaları bulunmaktadır. Bu kontrol noktalarında hücre, siklusa devam etmesi için gereken sinyalleri aldığı takdirde hücre, siklusu tamamlayarak, bölünür. Ancak hücre, siklusa devam etmemesi gereken bir sinyal aldığı zaman siklusta durur (94).

G_1 -S kontrol noktası, S evresinden hemen önce gerçekleşmektedir. DNA'da oluşan hasara yanıt olarak, tümör baskılayıcı gen olan p53 uyarılır. Uyarılan p53, p21 ekspresyonunu aktive eder ve aktive olan p21 de siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerine bağlanarak siklusu G_1 evresinde durdurur. p53, DNA tamir mekanizması için gerekli proteinleri uyarır. Eğer hasar düzeltilemez ise hücre apoptoza gider (10, 96, 97).

G_2 -M kontrol noktasında, replike olamamış DNA'ya sahip hücrelerin, siklusa devam etmeleri durdurulur. MPF (maturation promoting factor) protein kinaz (cdc2/siklinB) kompleksi inaktive edilerek, siklusun mitoz geçişi durdurulur (10, 97).

M evresi kontrol noktasında ise, metafazdan anafaza geçiş düzenlenir. Bu kontrol noktasında, kinetokorlara uygun mikrotübül bağlanması ve kromozomların iğ iplikçikleri üzerinde düzgün bir şekilde sıralanması sağlanır (10, 97).

Bu kontrol noktalarında varsa genetik hasarlar düzeltilir. Eğer genetik hasar düzeltilemez ise, hücrenin siklusa ilerlemesini durdurabildiği gibi, genetik hasarın yeni nesillere aktarılmasını engellemek için apoptozu (programlı hücre ölümü) aktive edebilir. Hücre siklusunda bir faz tam olarak tamamlanmadan bir sonraki faza geçilirse genetik materyal doğru bir şekilde kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir (92, 93, 97, 98).

2.6.1. Siklinler

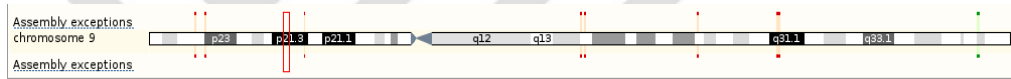
Hücre siklusunu regülasyonunda, siklin, siklin bağımlı kinaz (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitör (CDKi) molekülleri görev almaktadır. Siklinler, hücre siklusunun her evresinde bulunan ancak, hücre içindeki miktarı döngüsel olarak değişiklik gösteren proteinlerdir. Siklin düzeyi interfaz evresi (G₁, S ve G₂) süresince hızla artar. Siklusun devamlılığında M evresinde ise, siklin düzeyi aniden düşer. CDK'lar, diğer proteinleri fosforilleyerek, onları aktif veya inaktif hale getiren protein-kinaz enzimleridir. Bunların miktarı hücre içinde sabit olmakla birlikte çoğu zaman inaktif formda bulunurlar. CDK'ların aktif forma geçmesi için sikline bağlanması gerekir. Bir CDK'nın aktivitesi, onun bağlandığı siklinin hücre içindeki miktarına bağlı olarak değişir (94). CDK'lar protein fosforilasyonun yanı sıra, DNA zincirinin açılmasında da görev alan bir enzimdir. CDKi ise, CDK aktivitesini kontrol eden inhibitör proteinleridir. CDKi'ler, oluşan siklin-CDK kompleksini ve DNA replikasyonunu engelleyerek hücre siklusunu durdururlar. CDKi'ler hücre siklusunu durdurduktan sonra, TBG'ler ile etkileşime geçmektedirler (10, 94).

İnsan hücreleri, en az 29 siklin ve siklin ilişkili proteinler ile etkileşimde bulunan 13 tane CDK'ya sahiptir. CDK'lar öncelikle hücre siklusunu düzenlemek için birçok siklinle birbirini etkilemektedir (CDK 1, 2, 4, 6). Ancak tek siklin ile aktive olan CDK (CDK7, 9)'lar, genellikle transkripsiyon düzenlenmesinde rol oynarlar. CDK'ların pozitif yönde aktivasyonu, CDK7, siklin H ve MAT1'den oluşan CDK aktive protein kinaz (CAK) kompleksi tarafından fosforillenmesiyle oluşur. CDK aktivasyonunun negatif düzenlenmesi iki farklı protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bunlar, CIP

(CDK ile birbirini etkileyen protein) ve KIP (kinaz inhibitör protein) ailesidir. CIP/KIP ailesinde $p21^{CIP1}$, $p27^{KIP1}$ ve $p57^{KIP2}$ bulunmaktadır (99, 100).

2.7. SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ 2A (CDKN2A) / P16^{INK4A}

9. kromozomun kısa kolunun p21 bölgesinde lokalize olan CDKN2A geni, 8.5 kb uzunluğunda olup, iki intron ile üç ekzon içermekte olup, $p14^{ARF}$ ve $p16^{INK4A}$ proteinlerini kodlamaktadır. $p16^{INK4A}$, 16 kDa molekül ağırlığına sahip, 156 aminoasitten oluşan ve hücre siklusunun negatif regülatörü olan önemli bir proteindir (101). Kanser gelişiminde inaktive olan tümör baskılayıcı proteinlerinden biri de siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A) veya diğer adlandırmayla çoklu tümör baskılayıcı geni 1 (MTS1) tarafından kodlanan $p16^{INK4A}$ proteinidir (Şekil 2-2) (102, 103).

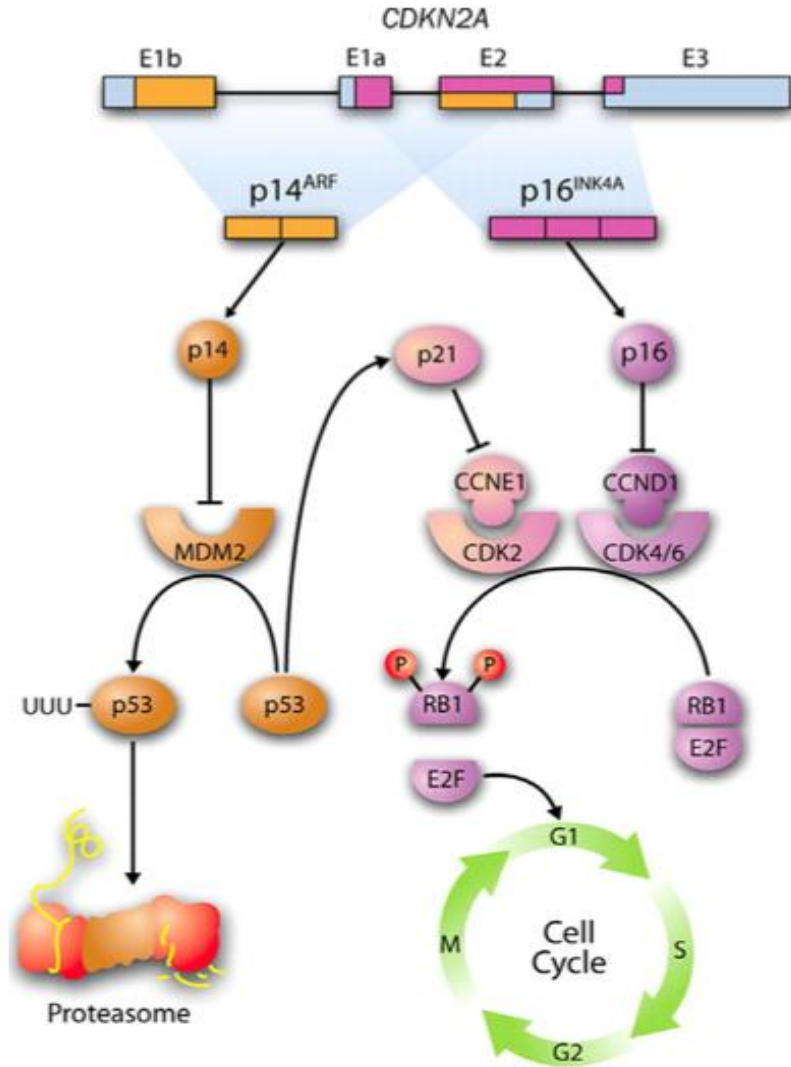


Şekil 2-2: 9. kromozoma ait ideogram üzerindeki p16 gen lokalizasyonu

Ensembl (104)'dan

$p16^{INK4A}$ proteini; siklin bağımlı kinazları (CDK) inhibe eden INK4A gen ailesinin önemli bir üyesidir. INK4A gen ailesinin diğer üyeleri; $p15^{INK4B}$, $p18^{INK4C}$ ve $p19^{INK4D}$ 'dur. Bu INK4A gen ailesi üyeleri, hücre siklusunun G1 evresinde, CDK4/6 ile bağlanarak, CDK'ların aktivitelerini inhibe etmektedirler. $p16^{INK4A}$, AR proteinleri (ankyrin repeat) sayesinde CDK4/6'ya bağlanır. CDK4/6'nın aktif kompleks oluşturması için siklin D proteinleri ile etkileşime geçmesi gerekmektedir. Siklin D proteini ile bağlanan CDK4/6, aktif kinaz kompleksini oluşturur. CDK4/6'nın oluşan bu kinaz kompleksini inhibe etmek için, INK4 proteinleri siklin D ile yarışır. Siklin D/CDK4/6 aktif kinaz kompleksi, E2F ile kompleks oluşturan TBG proteini olan retinoblastoma (Rb) genini fosforiller. Hücre siklusunda G1'den S evresine geçişi kontrol eden Rb geni fosforillenerek, E2F transkripsiyon faktöründen ayrılır ve hücre siklusu S evresinde ilerler. Siklin D/CDK4/6 kompleksi hücre siklusu başladığında aktive olmaktadır (Şekil 2-3) (102, 105, 106, 107).

Karsinogenez mekanizmasında $p16^{INK4A}$, siklin D tarafından aktive edilen CDK4/6 kinaz kompleksini inhibe eder. CDK4/6'ya bağlanamadığı için fosforillenemeyen Rb, E2F transkripsiyon kompleksinden ayrılmaz ve hücre siklusu S evresine devam edemez. Karsinogenez mekanizmasında $p16^{INK4A}$ 'nın eksikliğinde ise, Rb hiperfosforile olarak, transkripsiyon faktörü E2F'in serbest kalmasına neden olur ve hücre siklusu G1'den S evresi geçişinde baskılanamaz (108).



Şekil 2-3: CDKN2A lokusu ve hücre siklus kontrol mekanizması

Pérez-Sayáns M. (108)'den

CDKN2A lokusunda gözlenen genetik değişiklikler sonucunda, baş boyun, akciğer, mide, özofagus, over, prostat, kolon, lenfoma, melanoma, deri ve pankreas, kanseri gibi çeşitli kanserler geliştiği bildirilmiştir (109). Baş boyun tümörlerinin yaklaşık %70'inde, 9p21 bölgesinde lokalize olan tümör baskılayıcı gen proteinleri p16^{INK4A}(CDKN2A) ve p15^{INK4B}'de heterozigozite kaybı (LOH) olduğu belirtilmiştir. p16 geninin inaktivasyonuna yol açan genetik değişiklikler, hücre proliferasyonunun kontrolden çıkmasına ve tümörogeneze neden olabilir. BBYEHK'da dahil olmak üzere bir çok önemli kanserlerde p16^{INK4A}(CDKN2A) geni sıklıkla değişime uğramıştır. Buna karşılık, p16 gen mutasyonu ve homozigot delesyonu primer tümörlerde daha azdır. Son yapılan çalışmalarda, p16 gen inaktivasyonu için temel mekanizmalardan biri de, 5'CpG adacığının metilasyonu yoluyla transkripsiyonun durdurulması olduğu gösterilmiştir (109, 110, 111, 112,113).

Primer BBYEHK'lerde p16 inaktivasyonu oranları %10 mutasyonla, %33 homozigot delesyonla, %20'de metilasyonla olduğu rapor edilmiştir. BBK gelişiminde önemli bir rolü olduğu düşünülen oral premalign lezyonlarda da p16 inaktivasyonu sıklıkla gözlenmektedir (114).

p16^{INK4A} ekspresyon kaybının, oral kavitenin primer tümörlerinde olduğu gibi, premalign lezyonlarında da gözlendiği bildirilmiştir. Buna rağmen, yapılan bazı çalışmalarda, tümör hücreleri ve kanser dokularında, Rb'nin kontrol mekanizmasının ortadan kalkması durumunda (deregülasyonu), p16 ekspresyon seviyesinin arttığı bildirilmiştir. Rb'nin kaybı, bir çok tümörde sıklıkla gözlenen bir durumdur ve kontrolsüz hücre çoğalması ile ilişkilendirilmektedir (115). p16 geni, Rb proteinini tarafından transkripsiyonel baskılandığında, p16 mRNA ve proteini, Rb'nin eksik olduğu hücrelerde yüksek seviyede biriktiği gözlenmektedir. Aynı zamanda, p16 mRNA ve proteininin birikimi; hücre yaşlanma, Ras'ın onkojenik hiperaktivitesi ve Rb'nin inaktivasyonu gibi durumlara bir yanıt olabileceğini bildirilmiştir (107, 116).

Yapılan çalışmalarda, p16^{INK4a} ile OLP arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar, p16 ekspresyon seviyesindeki değişimlerin, OLP'nin olası malign dönüşümü hakkında bilgi verebileceğini öne sürmüşlerdir. Diğer araştırmacılar ise, OLP olgularında gözlenen p16 gen ekspresyon değişimlerinin, malign dönüşüm için yeterli bir marker olmadığını belirtmişlerdir (11, 116, 117, 118, 119, 120).

2.8. FLUORESANS IN SITU HİBRİDİZASYON YÖNTEMİ

Fluoresans in situ hibridizasyon (FISH), esasen sitogenetik ve moleküler biyolojiyi bir araya getirerek, sitogenetik analizlerin verimliliğini ve kesinliğini büyük ölçüde arttıran bir moleküler sitogenetik tekniktir. FISH, sitolojik ve histolojik preparatlarda hücre düzeyinde nükleik asit dizilerinin belirlenmesini ve yüksek rezolüsyonlu görüntülenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem, çift iplikli DNA zincirlerinin denatüre edilerek tek iplikli yapı formuna getirilmesi ve kendine komplementer olan fluoresan işaretli hedef nükleik asit ile birleşmesi esasına dayanır. Klinik laboratuvarlarda FISH, konvansiyonel kromozom analizi için yardımcı bir teknik olmakla birlikte, yapısal ve edinilmiş kromozom anomalilerinin tespiti ve karakterizasyonu için tek başına bir yöntemdir (121, 122).

FISH tekniği, hedefin türüne göre uygulanır. FISH, mitotik hücreden elde edilmiş metafaz kromozom preparatlarının bulunduğu DNA'ya ya da hücre siklusundaki mitotik olmayan faz olan interfaz çekirdeğindeki DNA'ya uygulanabilmektedir. Bu yöntem, hücre kültürü ile elde edilmiş hücrelere veya parafine gömülmüş dokulara da uygulanabilmektedir (121, 122).

FISH tekniği, spesifik kromozomlar üzerinde bulunan lokus haritasını, yapısal kromozom düzenlemelerini, sayısal kromozom anomalilerini belirlemek ve küçük delesyonlar gibi belirlenemeyen anomalileri ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır. Aynı zamanda FISH, fiziksel haritalanmanın dahil olduğu, DNA replikasyonu gibi biyolojik süreçlerin çalışması, RNA süreçleri ve gen ekspresyonunu, kromozom evrim çalışması, dizilerin korunması ve kromozomların yeniden yapılanması gibi uygulamaları araştırmak için de kullanılmaktadır. Genel olarak FISH, kanser sitogenetiği, mikrodelsiyon sendromlarının tanısı, prenatal tanı, gen haritalanması, tümör biyolojisi, gen ekspresyon analizi gibi kullanım alanlarına sahiptir (92, 121, 122).

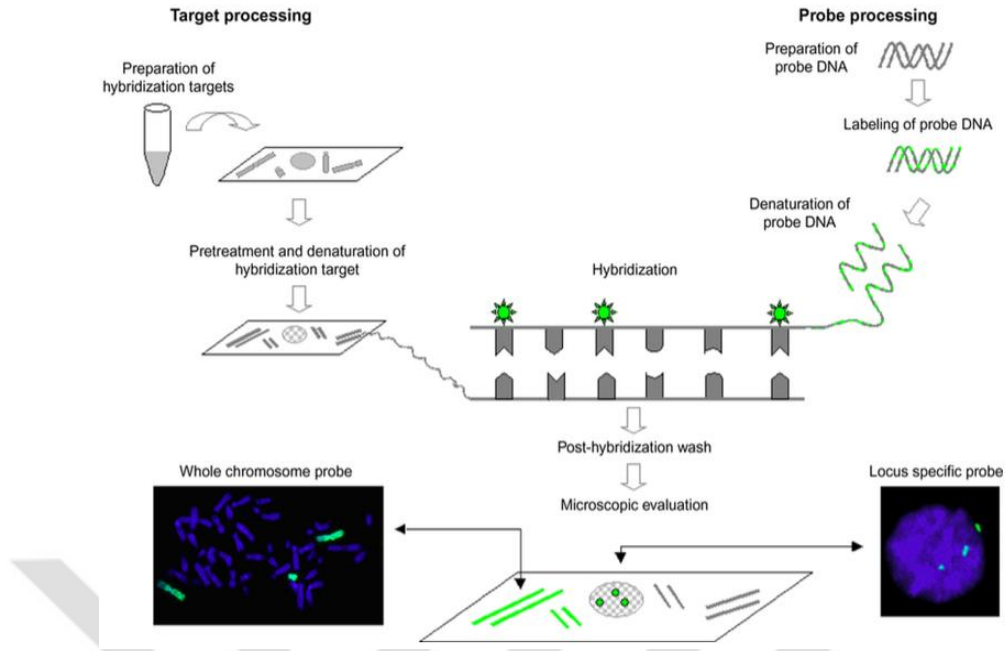
FISH metodolojisinde; çift iplikli DNA zincirleri, kimyasal madde ya da ısı yardımıyla denatüre edilerek, tek iplikli yapı formuna getirilir. Tek iplikli yapı formundaki DNA ile kendine komplementer olan fluoresan işaretli hedef nükleik asit dizisi ile hibridize edilir. Hibridize olan DNA ve prob hibridizasyon sonrası yıkama solüsyonları ile yıkanır. DNA boyası olan DAPI uygulandıktan sonra preparatlar, fluoresan mikroskopunda uygun filtreler ile incelenir (123).

Aynı yöntem kullanılarak, periferik kan, kemik iliği, bronş lavajı gibi farklı vücut sıvıları, parafine gömülmüş ve arşivlenmiş dokulardaki interfaz nukleuslarına da, FISH (interfaz FISH) uygulanmaktadır (123, 124).

İnterfaz FISH ile, sentromer problemleri kullanılarak kromozom sayı anomalileri veya lokusa spesifik problemler ile de belli kromozom/gen bölgelerinin değişimleri, kültüre gerek olmadan (direkt) saptanabilmektedir. İnterfaz FISH'in en sık kullanılan uygulama alanlarından biri de, sayısal kromozomal anomaliliklerin (anöploidi ve poliploidi) belirlenmesidir. Ayrıca pre/postnatal tanıları ve kanser tanıları/prognozu için somatik gen değişimleri incelenmektedir. Sentromerik DNA problemlerinin ve perisentromerik/heterokromatin kromozomal bölgeleri oluşturan kromozoma spesifik DNA dizilerinin verimliliği %100'e yakındır (124).

İnterfaz FISH tekniğinde kullanılan lokusa özgü problemler, genellikle preimplantasyon, prenatal, postnatal tanıları ve kanser sitogenetiği için kullanılmaktadır. Lokusa özgü prob ile uygulanan interfaz FISH tekniği, aynı zamanda kromozomlar arasındaki translokasyonlar sonucunda oluşan gen füzyonlarının belirlenmesinde önemli bir yöntemdir. Ancak bu problemlerin hibridizasyon verimliliği %40 ile %70 arasında değişmektedir. Bu nedenle bu problemler, kanser hücrelerinde iyi bilinen kromozomal yeniden düzenlenmelerin belirlenmesinde ve daha az sıklıkta klinikte gözlenen delesyon veya duplikasyonların teşhisinde kullanılmaktadır (124).

Genellikle FISH tekniğinde uygulanan kromozom boyama problemlerinin, interfaz hücrelerinde kullanılmasının yararsız olduğu düşünülmektedir. Bu prob interfaz hücrelerinde, sadece nükleer kromozom bölgelerinin tanımlanması için kullanılmaktadır (124).



Şekil 2-4: FISH protokolü

Tönnies H. (123)'den

2.8.1. FISH Problemleri

FISH tekniği, floresans özellik taşıyan ve prob olarak adlandırılan bir DNA dizisinin, hedeflenen bölgeye özgü DNA dizileri ile hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. FISH tekniğinin direkt ve indirekt işaretleme olmak üzere iki tipi vardır. Direkt işaretlemede, DNA probunun yapısına floresan moleküller dahil edilerek nükleotid işaretlenmektedir. İndirekt işaretlemede ise, proba floresan olmayan yani hapten moleküller dahil edilerek nükleotid işaretlenmektedir. İn situ hibridizasyonunda, direkt işaretlemenin avantajı, farklı fluorokrom ile işaretli birden fazla probun, aynı anda kullanılabilir olmasıdır (125). FISH metodolojisi, direkt olarak bir fluorokrom (rhodamin veya fluorescein-5-tiosiyanat) veya dolaylı olarak kullanılan haptenler (biyotin veya digoksinin) ile işaretlenen DNA probunun hibridizasyonunu kapsamaktadır (126).

Prob çeşitleri, hibridizasyon amacına uygun olarak, tüm kromozom boyama problemleri, lokusa özgü problemler, tekrarlayan dizilere özgü problemler ve tümör problemleri olmak üzere dört ana başlık altında toplanmaktadır. (125).

- 1) Tüm Kromozom Boyama Problemleri (Kromozom Koluna Spesifik Prob)
- 2) Lokusa Özgü Problemler
- 3) Tekrarlayan Dizi (Alfa Satelit) Problemler
- 4) Tümör Problemleri

2.8.1.1. Tüm Kromozom Boyama Problemleri (Kromozom Koluna Spesifik Prob)

Painting olarak da adlandırılan, tüm kromozom problemleri, ilgili kromozomun tümünü boyamak için tasarlanmıştır. Bu problemler, morfolojik olarak çözümlemede zor olan sitogenetik aberasyonları bulmak için kullanılmaktadır. Bu DNA problemleri, kromozom diseksiyon veya flow sorted kromozomlardan elde edilen, metafaz plağındaki özgün kromozomların işaretlenmesine izin verir ve homolog olmayan insersiyonlar ve translokasyonlar gibi yapısal ve sayısal aberasyonların karakterizasyonu ve belirlenmesi için kullanılır. Kromozomların uzun veya kısa kolları ve kromozom mikrodiseksiyonu ile elde edilen kısmi kromozom problemleri, intrakromozomal perisentrik inversiyon tespiti için değerli bir araçtır (126).

2.8.1.2. Lokusa Özgü Problemler

Lokusa özgü problemler, kromozom üzerinde bulunan belirli dizileri hedeflemektedir. Bu diziler plazmid ($1\pm 10\text{kb}$), PAC, YAC ve BAC ($80\text{kb}\pm 1\text{Mb}$) gibi çeşitli vektörlerden klonlanarak elde edilir. Lokusa özgü problemler, interfaz veya metafaz evrelerindeki kromozomlarda bulunan mikrodelsiyon ve mikroduplikasyonları belirlemek için kullanılır (126).

2.8.1.3. Tekrarlayan Dizi (Alfa Satelit) Problemleri

Moleküler teşhiste, tekrarlayan dizi problemleri esas olarak, yüksek hassasiyet ve iyi hibridizasyon verimliliği gibi özellikleri ile, anöploidi teşhisi ve marker kromozomların tanımlanması için kullanılır. Bu problemler, interfaz hücre analizleri için, sitolojik preparatların yanı sıra formalin ile fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku parçaları için de uygulanmaktadır. Bu tekrarlayan problemlerin hibridizasyon süresi kısadır ve oldukça hızlı sonuç elde edilir (126). Tekrarlayan dizilere özgü prob grubuna, alfa satelit sentromer problemleri, heterokromatin problemleri ve β -satelit problemleri dahildir (125). Tekrarlayan dizi prob sınıfından olan telomerik problemler ve subtelomerik problemler sadece metafaz FISH için uygulanmaktadır.

Tekrarlayan dizi problemleri, binlerce kopyadan oluşan kısa dizileri içeren kromozom bölgelerini hedeflemektedir. Bu problemler, metafaz veya interfaz evrelerinde bulunan sayısal anomalileri hızlı bir şekilde belirlemek için uygundur (126).

2.8.1.4. Tümör Problemleri

Tümör genetiğinde, kromozomal yeniden düzenlemelerin çoğu, önemli hastalıkların teşhisi ve prognozu ile ilişkilidir. Metafaz ve interfaz hücrelerinde uygulanan tek kopya lokusa spesifik problemleri ile, kromerik gen füzyonları, inversiyonlar, delesyonlar ve onkogen amplifikasyonları teşhis edilmektedir. Tümör problemleri sınıfında, tek füzyon problemleri, *break-apart* problemleri, çift füzyon problemleri, tümör baskılayıcı genler için delesyon problemleri, onkogen amplifikasyon problemleri bulunmaktadır (123).

2.9. İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmunohistokimya (IHC) tekniği, sitolojik preparatlarda, dondurulmuş doku kesitlerinde ve parafine gömülmüş histolojik doku kesitlerinde uygulanabilmektedir. IHC, antijene spesifik bir antikor kullanarak, histolojik ve sitolojik preparatlardaki spesifik antijenlerin saptanmasını sağlayan bir yöntemdir (127, 128). IHC tekniğinde, antijene özgü kullanılan antikorlar, çeşitli hayvan konaklarından üretilmektedir. Üretim tekniğine bağlı olarak antikorlar, monoklonal ve poliklonal olarak adlandırılmaktadır. Monoklonal antikorlar, bir hayvan konakçıda hibridoma hücrelerinden üretilmektedir. Poliklonal antikorlar ise, canlı bir hayvanda bir çok farklı hücreden meydana gelmektedir (129). Kullanılan antikora bağlanmış çeşitli maddeler ile (fluoresans marker, koloimetrik olarak saptanabilen enzimler) çeşitli seviyelerde oluşan antikor-antijen kompleksleri ışık mikroskopunda saptanabilmektedir (128). İmmunohistokimya protokollerinin temeli, antijen-antikor bağlanmasına dayanmaktadır. Primer antikorun ona spesifik antijene bağlanması immunohistokimya yöntemi için önemli bir basamaktır. Kullanılan materyalde, antijene bağlı primer antikorun üzerine, işaretlenmiş ikinci bir antikor kullanılarak primer antikorlar tespit edebilmektedir. Buna bağlı olarak, direkt ve indirekt olmak üzere, iki temel immunohistokimyasal yöntem kullanılmaktadır (130).

2.9.1. Direkt İmmunohistokimya Yöntemi

Direkt yöntem, antijen ve işaretli antikor arasında doğrudan bir reaksiyon oluşturan basit ve tek aşamalı bir işlemdir. Bu yöntemde, primer antikor; fluoresan

boya, biyotin veya enzim gibi çeşitli maddeler ile işaretlenmektedir. Fluorofor ile işaretlenmiş antikor fluoresan mikroskobu kullanılarak doğrudan görüntülenebilmektedir. Biyotin ile işaretlenmiş antikorlar ise, fluorofor veya enzim ile konjüge edilmiş streptavidin kullanılarak tespit edilebilir ve bir enzim kromojenik sistem ile görüntülenebilmektedir. Direkt yöntem, yüksek avidite ve yüksek yoğunluklu antijenlerin (>10 K molekül/ hücre) lokalizasyonu için antikorlar kullanarak uygulanabilmektedir (130).

2.9.2. İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

İndirekt yöntem, daha yüksek duyarlılık nedeniyle, direkt yöntemle göre, daha yaygın olarak kullanılmaktadır. İndirekt yöntem, işaretlenmemiş primer antikor üzerine fluorofor, biyotin veya enzim gibi maddelerle işaretlenmiş sekonder bir antikor kullanılması sonucunda gerçekleştirilmektedir. Yöntemde sekonder antikor basamağının olması, sinyal amplifikasyonu için imkan vermektedir. Bununla birlikte, düşük yoğunluklu antijenler için (>2 K, <10 K molekül/ hücre), triamid ile yapılan immünohistokimyasal sinyalin amplifikasyon için kullanılması tavsiye edilmektedir. (130).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Gereçler

Buzdolabı (Arçelik 4042 T Plus +4°C)

Derin dondurucu (Arçelik, Altus)

Denatürasyon ve Hibridizasyon Cihazı (ThermoBrite StatSpin)

Elektronik Terazı (Precisa XB220A)

Etüv (Memmert BM400, Nüve FN400)

FISH Yönteminde Kullanılan Image Analyser (MetaSystems Isis Fluorescence Image Analysis System)

Fluoresans Mikroskobu (Olympus BX51)

Hot Plate (J.P. Selecta)

Işık Mikroskobu (Nikon)

Manyetik Karıştırıcı (Are Velp Scientifica)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Mikropipet (Medispec plus 10 (0,5-10µl), Discovery Comport (100-1000µl))

Mikrosantrifüj (Hettich Mikroliter)

Mikrotom cihazı (Leica, Modell, RM 2125)

Su Banyosu (Memmert)

Termometre

3.1.2. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Cam Malzemeler

Beher (50, 100, 250 ml)

Balon joje (250, 500 ml)

Erlenmayer (250, 500, 1000 ml)

Mezür (10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ml)

Şale (100 ml)

3.1.3. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Distile Su

Pretreatment Kit (Cytocell Ltd., Cambridge, UK.)

Pretreatment Kit Enzimi (Cytocell Ltd., Cambridge, UK.)

Ksilol (Merck)

KCl (Merck)

NaCl (Carlo Erba)

KH₂PO₄ (Merck)

Na₂HPO₄.2H₂O (Merck)

NaH₂PO₄.H₂O (Merck)

triNaCitrat.2H₂O (Appli Chem)

%96 Ethanol (Merck)

İmmersiyon yağı (Biostain)

3.1.4. IHC Yönteminde Kullanılan Antikor

Biocare Medical, p16^{INK4a} Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody, Control Number: 902-3007-091911 (Biocare Medical, LLC., 4040 Pike Lane, Concord, CA 94520, USA)

3.1.5. FISH Yönteminde Kullanılan Prob

Cytocell Aquarius, p16 Deletion Probe (Cytocell Ltd., Cambridge, UK)

p16, 9p21.3, Red (kırmızı)

D9Z3, 9p12, Green (yeşil)

3.1.6. FISH ve IHC Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

3.1.6.1. IHC Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

EDTA'lı Buffer, 1000ml (SycTek Laboratories)

Peroxide Block, 125ml (SycTek Laboratories)

Super Block, 125ml (SycTek Laboratories)

SensiTek Anti-Polvalent Biotinylated Antibody, 125ml (SycTek Laboratories)

SensiTek HRP, 125ml (SycTek Laboratories)

AEC Substrate Buffer, 125ml (SycTek Laboratories)

AEC Chromogen, 2ml (SycTek Laboratories)

Mayer's Hematoxylin, 125ml (SycTek Laboratories)

PBS

3.1.6.2. FISH Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

Tablo 3-1: Posthibridizasyon yıkama solüsyonları

<u>20xSSC</u>	
NaCl	43,8 g
triNaCitrat.2H ₂ O	22,05 g
Distile su	250 ml
<u>0,4xSSC</u>	
20xSSC	2 ml
Distile Su	98 ml
<u>2xSSC</u>	
20xSSC	50 ml
Distile Su	450 ml
pH:7	

Tablo 3-2: Hibridizasyon sonrası görüntüleme solüsyonları

<u>PBS (x1)</u>	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,4 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Distile su	1000 ml
<u>DAPI Solüsyonu</u>	
Dapi Buffer	
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,178 g
Distile Su	100 ml
Na ₂ HPO ₄	10 mM
Dapi Stok Solüsyon	
Dapi Buffer	5 mg/ 100 ml
Kullanma Solüsyonu	
Stok Solüsyon	1: 100
Dapi Buffer Stok Solüsyonu	1: 100
pH:7	

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Materyal Seçimi

Çalışmamızda kullanılan materyaller İstanbul Üniversitesi Klinik Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı arşivinden elde edilmiştir. Histopatolojik olarak, oral liken planus (OLP) tanısı alan 20 hastadan elde edilen materyal çalışma grubu kapsamına alınmıştır. Histopatolojik olarak, YEHK tanısı alan 20 olgunun preparatları pozitif kontrol grubuna, 20 yaş dış çekimi yapılan hastalardan alınan ülsersiz ve iltihapsiz dokulara ait 10 olguluk preparat da negatif kontrol grubuna dahil edilmiştir. Tanı sıkıntısı oluşturan ya da tanısı tam belirlenememiş ya da klinik bilgisi eksik olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Olgu seçiminde yaş ve cinsiyet dikkate alınmamıştır.

Çalışmamızın floresans in situ hibridizasyon yöntemi; İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik laboratuvarında, immunohistokimya yöntemi ise; İstanbul Üniversitesi Klinik Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Floresans in situ hibridizasyon (FISH) Yöntemi

3.2.2.1. FISH Yönteminde Preparatların Deparafinizasyonu ve Denatürasyonu

- Çalışma ve kontrol gruplarını oluşturan materyallerden elde edilmiş tüm örneklerden 2,5µm kalınlığında kesitler hazırlanmıştır ve doku örnekleri pozitif şarjlı lamlara alınmıştır.
- Kesitler lam üzerine iyice yapışmaları için 37°C sıcaklığındaki etüvde bir gece bekletilmiştir.
- Deparafinizasyon işlemi için, bir gece süresince bekletilen preparatlar, etüvde 85°C sıcaklığındaki ksilol şalesi içerisinde 30 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Kurumaya bırakılan preparatlar, oda sıcaklığında bulunan ksilol serilerinde 3'er defa 15 dakika bekletilerek geçirilmiştir.
- Ksilol serilerinden sonra tekrar kurumaya bırakılan preparatlar, rehidratasyon için oda sıcaklığında bulunan %100, %70 alkol serilerinden, sırayla 5 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Preparatlar, oda sıcaklığında taze distile su ile 2 defa 2'şer dakika yıkanmıştır.
- Preparatlar, su banyosunda sıcaklığı 98°C'de olan pretreatment kit (Cytocell Ltd., Cambridge, UK) solüsyonunda 35 dakika bekletilmiştir.
- Ardından tekrar oda sıcaklığında taze distile su ile 2 defa 3'er dakika yıkanmıştır.
- Lamların üzerinde bulunan örneklerin üstlerini kapatacak şekilde enzim (Cytocell Pretreatment Kit Enzimi, Cytocell Ltd., Cambridge, UK) solüsyonu damlatılmış ve 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir.
- Oda sıcaklığında, taze distile su ile 3 defa 2'şer dakika boyunca yıkanmıştır.
- Dehidratasyon için, oda sıcaklığında, sırasıyla %70, %85, %100, %100 alkol serilerinden 2'şer dakika geçirilen preparatlar, kurumaya bırakılmıştır.

- Dehidratasyon sonrasında prob, lam ve lamel 37°C’de 5 dakika bekletilmiştir.

3.2.2.2. FISH Yönteminde Prob Denatürasyonu

- Çalışacağımız örnek sayısına bağlı olarak, kullanılacak prob miktarı ependorf tüplerine bölünmüştür. Her olgu için 5µl p16 (Cytocell Aquarius, p16 Deletion Probe, Cytocell Ltd., Cambridge, UK) probu uygulanmıştır.
- Dehidratasyon sonrasında, 37°C’de bekletilen problar, örneklerin üzerine mikropipet yardımıyla konulmuş ve lamel ile kapatılmıştır. Lamelin etrafı, su geçirmeyen yapıştırıcı ile sabitlenmiştir.
- Preparatlar önceden 80°C ısıtılmış olan hot plate üzerinde 10 dakika bekletilerek denatüre edilmiştir.

3.2.2.3. FISH Yönteminde Hibridizasyon

Denatüre edilen preparatlar, 37°C sıcaklığında olan hibridizasyon cihazı içerisinde nemli bir ortam oluşturularak, yaklaşık 43 saat 30 dakika hibridizasyona bırakılmıştır.

3.2.2.4. FISH Yönteminde Posthibridizasyon Yıkama

- Hibridizasyon sonrasında cihazdan alınan preparatların etrafındaki yapıştırıcı, pens ile dikkatlice temizlenmiştir.
- Preparatlar, su banyosu içinde sıcaklığı 71°C olan 0,4xSSC solüsyonunda 20 saniye yıkanmıştır.
- Ardından oda sıcaklığında 2xSSC solüsyonunda 50 saniye yıkanmıştır.

3.2.2.5. FISH Yönteminde Hibridizasyon Sonrası DNA Boyasının Uygulanması

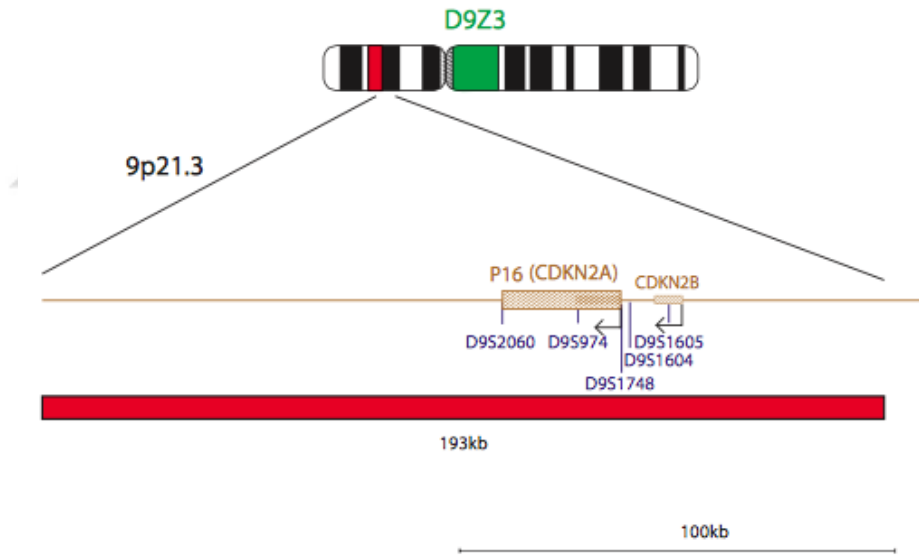
Hibridizasyon sonrası yıkama aşamaları tamamlanan preparatlar, oda sıcaklığında bulunan PBS solüsyonunda 3 dakika, Dapi solüsyonunda ise 7 dakika bekletilmiştir. Ardından tekrar temiz PBS solüsyonunda 3 dakika daha bekletilmiştir. Kurutulan lamaların üzerine, 20µl Dapi antifade eklenerek lamel ile kapatılmıştır. Mikroskopta incelenene kadar, kapalı bir kutu içerisinde tutulan preparatlar , +4 °C’de bekletilmiştir.

3.2.2.6. FISH Yönteminde Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar, Olympus BX51 floresans mikroskobunda DAPI, DAPI UV, FITC ve TEXAS RED filtreleri kullanılarak incelenmiştir. Sinyaller, floresans mikroskobuna bağlı bilgisayar sistemi (MetaSystems Isis Fluorescence Image Analysis System) ile değerlendirilmiş ve nukleuslar fotoğraflanmıştır.

3.2.2.7. FISH Yönteminde Sinyallerin Değerlendirilmesi

Doku örneklerinden hazırlanan preparatlara uygulanan FISH analizlerinde çalışma grubu, pozitif ve negatif kontrol grupları için, iki ayrı araştırmacı tarafından dokunun bazal ve subbazal tabakasında ortalama 200 hücre incelenerek değerlendirilmiştir. Görüntü ve doku kalitesine bağlı olarak, analiz edilen hücre sayısı farklılık göstermiştir (136-407).



Şekil 3-1: Kullanılan p16 gen probunun şematik görünümü:

9. kromozom üzerinde bulunan p16 gen (kırmızı) ve 9. kromozomunun sentromerine özgü kontrol bölgesi (yeşil)'nin şematik görünümü.

Cytocell (131)'den

3.2.2.8. İnterfaz FISH Skorlama

- Analiz edilen normal bir doku hücresi, 2 yeşil (p16 probunun 9. kromozom üzerindeki kontrol bölgesi), 2 kırmızı (p16 gen bölgesi) sinyal içermektedir (Şekil3-4).
- İncelenen hücrelerde 2 yeşil, 1 kırmızı sinyal gözlenmesi hemizigot delesyon, 2 yeşil, 0 kırmızı sinyal gözlenmesi homozigot delesyon, olarak değerlendirilmiştir.
- İncelenen hücrelerde 1 yeşil, 1 kırmızı sinyal gözlenmesi monozomi olarak değerlendirilmiştir.
- Kırmızı ve yeşil renkte işaretli olan probalar, kendi dalga boylarına spesifik filtreler ile görüntülenmiştir (DAPI, DAPI UV, FITC ve TEXAS RED).
- Hücre sınırları tam olarak belli olmayan, hasarlı veya parçalanmış, üst üste gelmiş nükleuslar, sitolojik olarak atipik hücreler değerlendirilmeye alınmamıştır.
- Aralarına bir sinyal giremeyecek kadar yakın olan ve birbirleriyle temas halinde olan sinyaller, tek bir sinyal olarak sayılmıştır.
- Sinyaller değerlendirilirken, birbirine çok yakın hücrelerdeki ve üst üste gelmiş olan sinyaller değerlendirilmeye alınmamıştır.
- Bu kriterler göz önünde tutularak, tüm doku preparatlarında, iki ayrı araştırmacı tarafından ortalama 200 hücre sayılmıştır (136-407).
- Sayılan hücrelerde, görülen sinyaller ile p16 gen delesyonu belirlenmiştir.

3.2.3. İmmunohistokimyasal (IHC) Yöntemi

3.2.3.1. IHC Yönteminde Kesit Alma

- Mikrotom cihazı yardımıyla çalışma ve kontrol gruplarını oluşturan bloklardan, 3-5µm kalınlığında kesitler alınmıştır.
- Alınan kesitler 54°C’de sıcak su banyosu içine suya bırakılmıştır.
- Sıcak su banyosu içindeki kesitler pozitif şarjlı lamlara alınmıştır.

- Hazırlanan preparatlar 37°C'ye ayarlanmış etüvde bir gece bekletilmiştir.

3.2.3.2. IHC Yönteminde Preparatların Deparafinizasyonu ve Dehidratasyonu

- 37°C'ye ayarlanmış etüvde bir gece süresince bekletilen preparatlar, daha sonra 85°C'ye ayarlanmış etüvde 30 dakika daha bekletilmiştir.
- Preparatlar oda sıcaklığında bulunan taze ksilol serilerinden 3 defa 10'ar dakika geçirilmiştir.
- Preparatlar, oda sıcaklığında bulunan %96'luk alkolden 2 defa 5'er dakika geçirilmiştir.

3.2.3.3. IHC Yönteminde Preparatların Yıkanması ve Boyanması

- Preparatlar oda sıcaklığında bulunan distile su ile 1-2 dakika yıkanmıştır.
- Lamlar EDTA'lı buffer solüsyonu (antijen retrieval) içerisine alınmıştır. Bu işlem, antijenleri açığa çıkarmak için uygulanmaktadır.
- EDTA'lı buffer solüsyon içerisinde bulunan preparatlar mikrodalga fırınında yüksek ısıda 5 dakika, orta ısıda 2 kez 5'er dakika, düşük ısıda 2 kez 5'er dakika bekletilmiştir.
- Preparatlar mikro dalga fırınından çıkarılmış ve oda sıcaklığına gelinceye kadar, yaklaşık 20-25 dakika, soğutulmuştur.
- Preparatlar distile su ile yıkanmıştır. Lamin etrafına bulunan fazla su temizlenip, dokunun kenarları pappen kalem ile işaretlenmiştir.
- Preparatlar oda sıcaklığında bulunan temiz PBS yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.
- Preparatlardaki endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için 5 dakika peroksit blok uygulanmıştır.
- Preparatlar tekrar oda sıcaklığında bulunan temiz PBS ile 2 dakika yıkanmıştır.
- Preparatlar 15 dakika super block uygulanmıştır.
- Preparatlar tekrar oda sıcaklığında bulunan temiz PBS ile 2 dakika yıkanmıştır.

- IHC boya kutusunun zeminine, dokuların kurumaması için, bir miktar su ilave edilerek, lamalar kutuya dizilmiştir.
- Lamaların üzerine primer antikor olarak p16 (p16^{INK4a} Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody, Biocare Medical, LLC., 4040 Pike Lane, Concord, CA 94520, USA) damlatılarak ve bir gece (overnight) +4°C’de bekletilmiştir.
- Bir gece süresince bekletilen preparatlar, yaklaşık 1 saat oda ısısına gelinceye kadar bekletilmiştir.
- Lamalar temiz PBS ile 2 dakika süresince yıkanmıştır.
- Yıkanan preparatlara, Biotin (2) solüsyonu damlatılarak, yaklaşık 20 dakika bekletilmiştir.
- Lamalar temiz PBS ile tekrar 2 dakika süresince yıkanmıştır.
- Lamalara HRP solüsyonu damlatılarak, yaklaşık 20 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Lamalar temiz PBS ile tekrar 2 dakika boyunca yıkanmıştır.
- Preparatlara kromojen olarak AEC damlatılmıştır ve dokularda kızarma gözlemlendiğinde, hemen distile suya alınmıştır.
- Distile su ile yıkanan preparatlara hemotoksilen damlatılarak, yaklaşık 10 saniye bekletilmiştir.
- Lamalar şeffaflaşınca kadar tekrar distile su ile yıkanmıştır.
- Dokular ıslakken subazlı kapatıcı yardımıyla lamel ile kapatılmıştır.

3.2.3.4. IHC Yönteminde Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar, ışık mikroskobunda, x100, x200, x400 objektif büyütmeleleriyle incelenmiştir. Örnekler, ışık mikroskobuna bağlı bilgisayar sistemi (Image Analysis System 5) ile değerlendirilmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.3.5. IHC Yönteminde Preparatların Değerlendirilmesi

İncelenen dokuların bazal ve subbazal tabasındaki p16 ekspresyon seviyeleri, nükleer boyanma olsun olmasın, sitoplazmik boyanma göz önünde bulundurularak

yapılmıştır. %5-10 arası pozitif 1+, %10-30 arası pozitif 2+, %30-60 arası pozitif 3+ ve %60-100 arası pozitif 4+ olarak yorumlanmıştır. Sitoplazmik boyanma gözlenmeyen veya %5'den daha az gözlenen örneklerde, nükleer boyanmaya bakılmaksızın, sitoplazmik boyanma negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analiz değerlendirilmesi için, IBM SPSS Statistics 21.0 (Statistical Package for Social Sciences) programı kullanılmıştır. Çalışma bulguları istatistiksel olarak değerlendirilirken, tamamlayıcı istatistiksel metotlar olan (ortalama, standart sapma (SS)) ve normal dağılıma sahip iki gruptan fazla verilerin karşılaştırılmasında Student't testi, iki grup veri değerlendirilmesinde ise Mann Whitney U testi ve örneklem sayısına bağlı olarak verilerin karşılaştırılmasında Fisher's testi kullanılmıştır. Spearman's korelasyon testi ile de, olgu grupları kendi aralarında, p16 ekspresyon seviyeleri ve FISH bulgu sonuçlarına göre analiz edilmiştir. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p<0,05$ seviyesinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

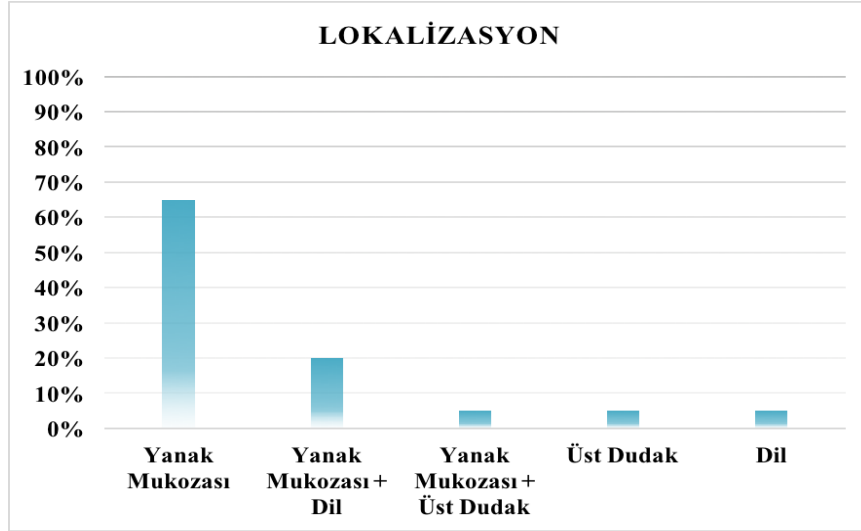
Çalışmamız, 2010 ile 2016 yılları arasında tanı almış, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Bilim Dalı arşivinden seçilmiş materyallerden oluşmaktadır. Çalışma grubuna, histopatolojik olarak tanısı belirlenmiş 20 OLP'li olgu dahil edilmiştir. Kontrol grupları, YEHK tanılı 20 olgu pozitif kontrol grubunu, sağlıklı 10 bireyden alınan örnekler ise negatif kontrol grubunu oluşturmaktadır.

Çalışmaya, klinik ve histopatolojik bulguların uyum gösterdiği OLP olguları dahil edilmiştir ve yaş ve cinsiyet gibi özellikler dikkate alınmamıştır. Toplam 20 olgudan oluşan çalışma grubunun %70'i (n=14) kadın ve %30'u (n=6) ise erkektir. Çalışma grubundaki olguların yaşları 25 ile 75 arasında değişmektedir ve yaş ortalaması $51,6 \pm 13,5$ 'dir. Çalışmada, 14 kadın olgunun yaş ortalaması $49,78 \pm 14$ ve 6 erkek olgunun yaş ortalaması $55,8 \pm 12,6$ 'dır (Tablo 4-1).

OLP olguları lokalizasyona göre incelendiğinde, olguların %65'inin (n=13) yanak mukozasında, %5'inin (n=1) üst dudakta, %5'inin (n=1) ise dilde tutulum gösterdiği tespit edilmiştir. Olguların %20'si (n=4) yanak mukozasıyla birlikte dilde, %5'i (n=1) ise yanak mukozasıyla birlikte üst dudakta tutulum göstermektedir (Şekil 4-1).

Pozitif kontrol grubunu oluşturan YEHK'lı olguların yaşları 30 ile 78 arasında değişmekte olup, tüm olguların ortalama yaşı $53,15 \pm 11,6$ 'dır.

Negatif kontrol grubunu oluşturan olguların yaşları 18 ile 51 arasında değişmekte olup, tüm olguların ortalama yaşı $31,3 \pm 10,7$ 'dir.



Şekil 4-1: OLP'nin lokalizasyona göre dağılımı

Tablo 4-1: Çalışma grubu olgularının cinsiyet, yaş, biyopsi lokalizasyonu ve klinik bulguları (n=20)

Olgu No	Cinsiyet	Yaş	Biyopsi Lokalizasyonu	Klinik Bulgular	
				Klinik Lokalizasyon	Klinik Görünüm
OLP 1	E	50	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ yanak mukozasında eritemli zemin üzerinde Wickham's çizgileri ve sol yanak mukozasında eritemli zemin üzerinde beyaz lezyonlar
OLP 2	E	55	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren, beyaz retiküler çizgiler
OLP 3	K	61	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozasında eritemli zemin üzerinde ağsı beyaz çizgiler
OLP 4	E	75	Sağ ve sol yanak mukozası ve üst dudak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası ve üst dudak mukozası	yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren ve üst dudakta yaygın likenoid lezyonlar
OLP 5	K	33	Üst dudak mukozası	Üst dudak mukozası	Üst dudakta yaygın likenoid lezyonlar
OLP 6	K	38	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren, retiküler liken çizgileri ve eroziv psödomembranöz lezyonlar
OLP 7	K	69	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren yoğun eritemli alanda Wickham's çizgileri

OLP 8	K	58	Dil altı mukoza	Dil altı mukoza	Dil altında eritematöz görünümünde yaygın lezyonlar
OLP 9	E	49	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozasında beyaz renkli alan şeklinde lezyonlar
OLP 10	K	25	Sağ yanak mukozası	Sağ yanak mukozası	Sağ yanak mukozası, mandibula sağ 5,6,7 no'lu diş bölgelerinde beyaz lezyonlar
OLP 11	E	40	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren, hiperkeratotik tarzda beyaz lezyonlar
OLP 12	K	55	Sağ ve sağ yanak mukozası ve dil mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası ve dil mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren ve dil mukozasında eritemli alanda Wickham's çizgileri
OLP 13	K	65	Dil sağ lateral ve sağ yanak mukozası	Dil sağ lateral ve sağ yanak mukozası	Dil sağ lateralinde 2-6 mm genişliğinde, 2-3 cm uzunluğunda bir hat şeklinde, hafif pembe beyaz renkli lezyon Sağ yanak mukozasında beyaz lezyonlar
OLP 14	K	38	Dil sağ lateral ve yanak mukozası	Dil sağ lateral ve yanak mukozası	Dil sağ lateral ve yanak mukozasında eritemli alan üzerinde yer yer beyaz plak görüntüsü
OLP 15	K	35	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozasında retiküler tipte Wickham's çizgileri ile uyumlu hiperkeratanize alan
OLP 16	K	68	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozası	Sol yanak mukozasında dudak köşesine doğru ağsı, yoğun hiperkeratinizasyon gösteren beyaz lezyonlar
OLP 17	E	66	Sağ yanak mukozası	Sağ yanak mukozası	Sağ yanak mukozasında alt alveol kretine doğru etrafı eritemli likenoid çizgiler
OLP 18	K	50	Sağ ve sol yanak mukozası ve dil dorsumu	Sağ ve sol yanak mukozası ve dil dorsumu	Sol yanak mukozasında 35 no'lu dişin yanak sulkusuna doğru yaygın eritemli alan içinde beyaz lezyon, 37 no'lu dişin kolesine doğru eroziv alan, Dil dorsumu ve sağ yanak mukozasında beyaz alanlar
OLP 19	K	50	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren ve yanak sulkusta yaklaşık 1 mm çapında beyaz alanlar
OLP 20	K	52	Sağ ve sol yanak mukozası	Sağ ve sol yanak mukozası	Yanak mukozasında bilateral tutulum gösteren eroziv alanlar

4.1. Olguların 9p21.3 için FISH Bulgularının Değerlendirilmesi

Olgular, 9. kromozomda bulunan 9p21.3 bölgesine spesifik kırmızı renk fluorezan maddeyle (texas red) ve 9.kromozomun sentromerine spesifik yeşil renkli fluorezan maddeyle (FITC) işaretli prob ile incelenmiştir. Doku ve görüntü kalitesine bağlı olarak, analiz edilen hücre sayısı farklılık göstermiştir ve iki ayrı araştırmacı tarafından ortalama 200 hücre değerlendirilmeye alınmıştır (136- 407). Analiz edilen dizomi (normal) bir hücre, 2 yeşil, 2 kırmızı sinyal içermektedir. İncelenen hücrelerde 2 yeşil, 1 kırmızı sinyal gözlenmesi hemizigot delesyon, 2 yeşil, 0 kırmızı sinyal gözlenmesi homozigot delesyon, 1 yeşil, 1 kırmızı sinyal gözlenmesi monozomi, 3 yeşil, 3 kırmızı sinyal gözlenmesi trizomi, 4 yeşil, 4 kırmızı sinyal gözlenmesi tetrazomi ve sayılamayacak kadar çok sayıda kırmızı sinyal gözlenmesi amplifikasyon olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda FISH tekniği için cut-off değerleri, sağlıklı olgu sonuçları göz önünde bulundurularak ortalama+3xS.S. formülü ile hesaplanmıştır. Bu formüle göre, monozomi için %20'nin, hemizigot delesyon için %9'un ve amplifikasyon için %4'ün üstündeki değerler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Sağlıklı olgularda gözlenmeyen homozigot delesyon, trizomi ve tetrazomi bulguları ise, gözlendiği olgu sayılarına göre pozitif olarak değerlendirilmiştir (132, 133).

FISH sinyal analizi yapılan 20 OLP olgusunun %100'ünde (n=20) %36-58 oranları arasında dizomi (normal) tespit edilmiştir. OLP olgularında farklı oranlarda birlikte görülen anomaliler; monozomi, hemizigot delesyon, trizomi ve amplifikasyondur. İncelenen olguların %100'ünde (n=20) farklı oranlarda monozomi gözlenmiştir. Olguların %65'inde (n=13) hemizigot delesyon, %35'inde (n=7) trizomi, %30'unda (n=6) ise amplifikasyon gözlenmesine rağmen, olguların hiç birinde homozigot delesyon ve tetrazomi gözlenmemiştir (Tablo 4-2, Tablo 4-5).

Tablo 4-2: OLP olgularının 9p21 FISH ve IHC analiz sonuçları

Olgu No	Dizomi (%)	Monozomi (%)	Delesyon (%)		Trizomi (%)	Amplifikasyon (%)	IHC Bulguları
			Hemizigot del (%)	Homozigot del (%)			
OLP 1	38	46	16	0	0	0	pozitif 3+
OLP 2	51	35	14	0	0	0	pozitif 4+
OLP 3	55	30	15	0	0	0	pozitif 3+
OLP 4	57	30	13	0	0	0	pozitif 3+
OLP 5	39	37	22	0	2	0	pozitif 4+
OLP 6	48	42	9	0	1	0	pozitif 4+
OLP 7	50	39	11	0	0	0	pozitif 2+
OLP 8	49	43	8	0	0	0	pozitif 4+
OLP 9	36	36	15	0	1	11	pozitif 4+
OLP 10	55	41	3	0	0	1	pozitif 3+
OLP 11	45	24	16	0	0	15	pozitif 3+
OLP 12	52	32	16	0	0	0	pozitif 3+
OLP 13	55	38	7	0	0	0	pozitif 1+
OLP 14	39	24	9	0	0	28	pozitif 4+
OLP 15	58	32	10	0	0	0	pozitif 3+
OLP 16	54	30	11	0	1	4	pozitif 4+
OLP 17	47	43	9	0	1	0	pozitif 4+
OLP 18	36	26	12	0	1	25	pozitif 3+
OLP 19	56	38	5	0	0	0	pozitif 2+
OLP 20	44	21	18	0	1	16	pozitif 3+

Pozitif kontrol grubunu oluşturan 20 YEHK'lu olgunun %100'ünde (n=20), %11-58 oranları arasında dizomi (normal) gözlenmiştir. YEHK'lu olguların FISH sinyal analizinde farklı oranlarda birlikte görülen anomaliler; monozomi, hemizigot delesyon, homozigot delesyon, trizomi, tetrazomi ve amplifikasyondur. YEHK'lı pozitif kontrol grubu olgularının, %85'inde (n=17) monozomi gözlenmiştir. YEHK'lı olguların

ayrıca %65'inde (n=13) hemizigot delesyon, %10'unda (n=2) homozigot delesyon, %40'ında (n=8) trizomi, %15'inde (n=3) tetrazomi ve %25'inde (n=5) amplifikasyon tespit edilmiştir (Tablo 4-3, Tablo 4-5).

Tablo 4-3: YEHK olgularının 9p21 FISH ve IHC analiz sonuçları

Olgu No	Dizomi (%)	Monozomi (%)	Delesyon (%)		Trizomi (%)	Tetrazomi (%)	Amplifikasyon (%)	IHC Bulguları
			Hemizigot del (%)	Homozigot del (%)				
YEHK 1	63	19	15	2	0	1	0	pozitif 3+
YEHK 2	48	25	10	0	0	0	16	pozitif 3+
YEHK 3	40	19	6	0	0	0	35	pozitif 4+
YEHK 4	68	27	5	0	0	0	0	pozitif 4+
YEHK 5	34	22	12	0	0	0	32	pozitif 2+
YEHK 6	11	13	8	0	1	0	67	pozitif 2+
YEHK 7	46	37	17	0	0	0	0	pozitif 3+
YEHK 8	54	33	3	0	3	0	7	pozitif 3+
YEHK 9	53	38	9	0	0	0	0	pozitif 4+
YEHK 10	53	40	5	0	2	0	0	pozitif 3+
YEHK 11	44	40	12	0	4	0	0	pozitif 4+
YEHK 12	55	37	8	0	0	0	0	pozitif 2+
YEHK 13	48	38	12	0	1	1	0	pozitif 4+
YEHK 14	45	35	20	0	0	0	0	pozitif 3+
YEHK 15	47	38	15	0	0	0	0	pozitif 4+
YEHK 16	42	28	23	0	7	0	0	pozitif 3+
YEHK 17	23	61	16	0	0	0	0	pozitif 2+
YEHK 18	48	31	20	1	0	0	0	pozitif 4+
YEHK 19	43	38	16	0	3	0	0	pozitif 2+
YEHK 20	34	52	11	0	2	1	0	pozitif 4+

Negatif kontrol grubunu oluşturan 10 sağlıklı bireyin FISH sinyal analizinde; normal (dizomi), monozomi, hemizigot delesyon ve amplifikasyon bulunmuştur. Negatif kontrol grubu olgularının, 10 olgusunda %5-15 oranı arasında monozomi, 10 olgusunda %1-6 oranı arasında hemizigot delesyon, 3 olgusunda da %1-3 oranı arasında amplifikasyon gözlenmiştir. Sağlıklı olguların hiç birinde homozigot delesyon, trizomi ve tetrazomi gözlenmemiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Sağlıklı bireylerin 9p21 FISH ve IHC analiz sonuçları

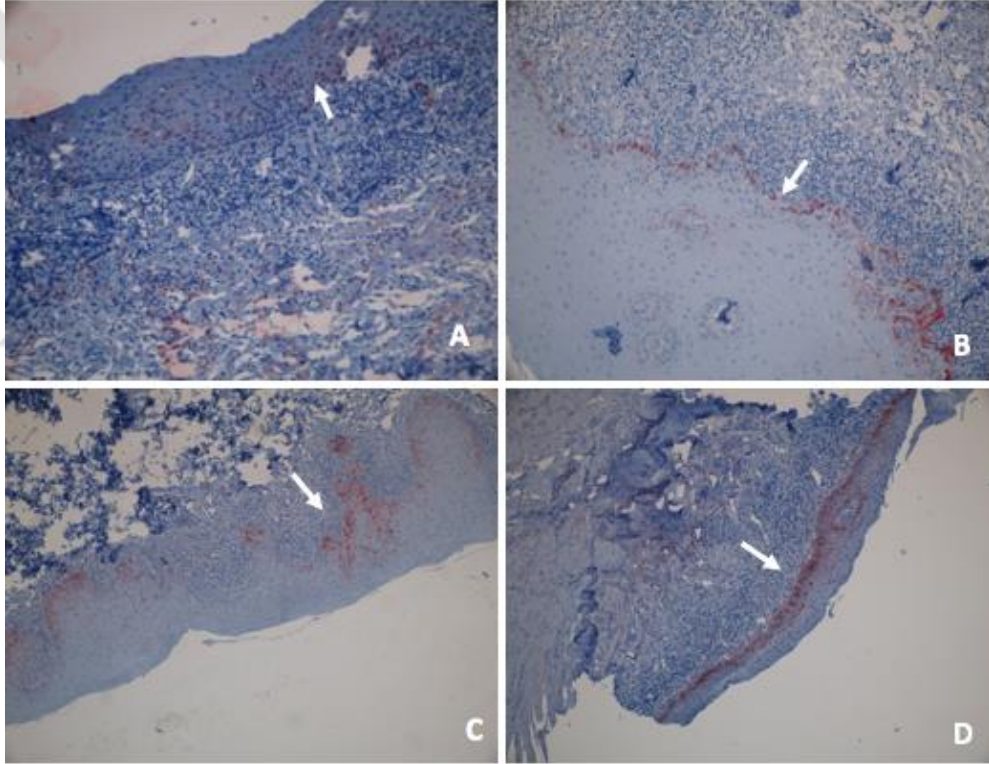
Olgu No	Dizomi (%)	Monozomi (%)	Delesyon (%)		Amplifikasyon (%)	IHC Bulguları
			Hemizigot del (%)	Homozigot del (%)		
Sağlıklı 1	90	5	5	0	0	Negatif
Sağlıklı 2	92	5	2	0	1	Negatif
Sağlıklı 3	79	15	5	0	1	Negatif
Sağlıklı 4	86	9	5	0	0	Negatif
Sağlıklı 5	91	8	1	0	0	Negatif
Sağlıklı 6	90	5	5	0	0	Negatif
Sağlıklı 7	84	10	6	0	0	Negatif
Sağlıklı 8	89	5	3	0	3	Negatif
Sağlıklı 9	85	12	3	0	0	Negatif
Sağlıklı 10	84	11	5	0	0	Negatif

Tablo 4-5: OLP ve YEHK olgularının FISH bulgularında görülen anomali yüzdeleri

Grup	N	Monozomi N (%)	Delesyon		Trizomi N (%)	Tetrazomi N (%)	Amplifikasyon N (%)
			Hemizigot del N (%)	Homozigot del N (%)			
OLP	20	20 (%100)	13 (%65)	0 (%0)	7 (%35)	0 (%0)	6 (%30)
YEHK	20	17 (%85)	13 (%65)	2 (%10)	8 (%40)	3 (%15)	5 (%25)

4.2. Olguların 9p21 için IHC Bulgularının Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal analiz ile olguların p16 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. İncelenen dokuların p16 ekspresyon seviyeleri, nükleer boyanmaya bakılmaksızın, sitoplazmik boyanma göz önünde bulundurularak yapılmıştır. %5-10 arası pozitif 1+, %10-30 arası pozitif 2+, %30-60 arası pozitif 3+ ve %60-100 arası pozitif 4+ olarak yorumlanmıştır. Örneklerde sitoplazmik boyama gözlenmeyen veya nükleer boyanma olsun olmasın, %5'den daha az gözlenen sitoplazmik boyanma negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Olguların IHC yönteminde primer p16 antikoruyla boyanma yüzdeleri:

- A) OLP 13 olgusu için, p16 primer antikorı ile pozitif 1+ boyanma gözlenen hücreler (x 200)
- B) OLP 7 olgusu için, p16 primer antikorı ile pozitif 2+ boyanma gözlenen hücreler (x 200)
- C) OLP 15 olgusu için, p16 primer antikorı ile pozitif 3+ boyanma gözlenen hücreler (x 100)
- D) OLP 8 olgusu için, p16 primer antikorı ile pozitif 4+ boyanma gözlenen hücreler (x 100)

IHC analiz sonuçlarına göre, çalışma grubunun oluşturulan OLP olgularının, %5'inde (n=1) pozitif 1+, %10'unda (n=2) pozitif 2+, %45'inde (n=9) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) pozitif 4+ boyanma gözlenmiştir (Tablo 4-2, Tablo 4-6).

YEHK'lı olguların IHC sonuçlarında ise; %25'inde (n=5) pozitif 2+ , %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) da pozitif 4+ boyanma gözlenmiştir (Tablo 4-3, Tablo 4-6).

Negatif kontrol grubunun IHC analizinde ise, %100'ünde (n=10) %5'den daha az oranda boyanma gözleendiği için, negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4-4, Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Olguların IHC Bulguları

Grup	N	Negatif N (%)	Pozitif +1 N (%)	Pozitif +2 N (%)	Pozitif +3 N (%)	Pozitif +4 N (%)
OLP	20	0 (%0)	1 (%5)	2 (%10)	9 (%45)	8 (%40)
YEHK	20	0 (%0)	0 (%0)	5 (%25)	7 (%35)	8 (%40)
Sağlıklı	10	10 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)

4.3. Olguların 9p21 için FISH ve IHC Bulgularının İstatistiksel Analizi

Olguların FISH bulgularına göre parametreler arasındaki ilişkisi, Student't test, Mann Whitney U test ve Fisher's tesleri ile incelenmiştir. FISH sonuçlarına göre, dizomi, monozomi ve hemizigot delesyon bulguları için; Student't test ile yapılan istatistiksel analizde, OLP ile YEHK olgu grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemesine rağmen ($p>0,05$), OLP'li olgular ile negatif kontrol grubu (sağlıklı) ve YEHK olguları ile negatif kontrol grubu (negatif) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmektedir ($p<0,05$) (Tablo4- 7).

FISH sonuçlarına göre, homozigot delesyon ve tetrazomi bulguları için; Fisher's test ile yapılan istatistiksel analizde, OLP ile YEHK olgu grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p>0,05$) (Tablo 4-8).

FISH sonuçlarına göre, amplifikasyon ve trizomi bulguları için; Mann Whitney U test ile yapılan istatistiksel analizde, OLP ile YEHK olgu grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p>0,05$) (Tablo 4-9).

Tablo 4-7: Olguların FISH yöntemiyle dizomi, monozomi, hemizigot delesyon bulgularına göre istatistiksel analiz sonuçları

Grup		N	Ortalama	SS	t	S.d.	p
Dizomi	OLP	20	48,25	7,290			<0,001*
	Sağlıklı	10	87,00	4,082			
	OLP	20	48,25	7,29	1,002	38	0,323
	YEHK	20	44,95	12,80			
	YEHK	20	44,95	12,804			<0,001*
	Sağlıklı	10	87,00	4,082			
Monozomi	OLP	20	34,35	7,169			<0,001*
	Sağlıklı	10	8,50	3,536			
	OLP	20	34,35	7,17	0,268	38	0,790
	YEHK	20	33,55	11,27			
	YEHK	20	33,55	11,27			<0,001*
	Sağlıklı	10	8,50	3,536			
Hemizigot delesyon	OLP	20	12,00	4,577			<0,001*
	Sağlıklı	10	4,00	1,633			
	OLP	20	12,00	4,58	0,125	38	0,702
	YEHK	20	12,20	5,53			
	YEHK	20	12,20	5,531			<0,001*
	Sağlıklı	10	4,00	1,633			

t: Student't test

*p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

Tablo 4-8: Olguların FISH yöntemiyle homozigot delesyon, tetrazomi bulgularına göre istatistiksel analiz sonuçları

Grup		N	0	1,2	p
Homozigot delesyon	OLP	20	20	0	0,487
	YEHK	20	18	2	
	Sağlıklı	10	10	0	
Tetrazomi	OLP	20	20	0	0,231
	YEHK	20	17	3	
	Sağlıklı	10	10	0	

Fisher's test

Tablo 4-9: Olguların FISH yöntemiyle trizomi ve amplifikasyon bulgularına göre istatistiksel analiz sonuçları

Grup		N	Medyan (Min, Max)	U	p
Trizomi	OLP	20	0 (0, 2)	171,00	0,445
	YEHK	20	0 (0, 7)		
	Sağlıklı	10	0 (0, 0)		
Amplifikasyon	OLP	20	0 (0, 28)	190	0,799
	YEHK	20	0 (0, 67)		
	Sağlıklı	10	0 (0, 3)		

U: Mann Whitney U test

IHC yöntemiyle incelenen olguların p16 ekspresyon seviyelerinin istatistiksel analizi için, Mann Whitney U test kullanılmıştır. OLP ile YEHK olgu grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p>0,05$) (Tablo4-10).

Tablo 4-10: Olguların IHC bulguları ve istatistik analiz sonuçları

Grup	N	Negatif	Pozitif 1+	Pozitif 2+	Pozitif 3+	Pozitif 4+	Medyan (Min, Max)	U	p
OLP	20	0	1	2	9	8	3 (1, 4)	190,5	0,799
YEHK	20	0	0	5	7	8	3 (2, 4)		
Sağlıklı	10	10	0	0	0	0	0 (0, 0)		

U: Mann Whitney U test

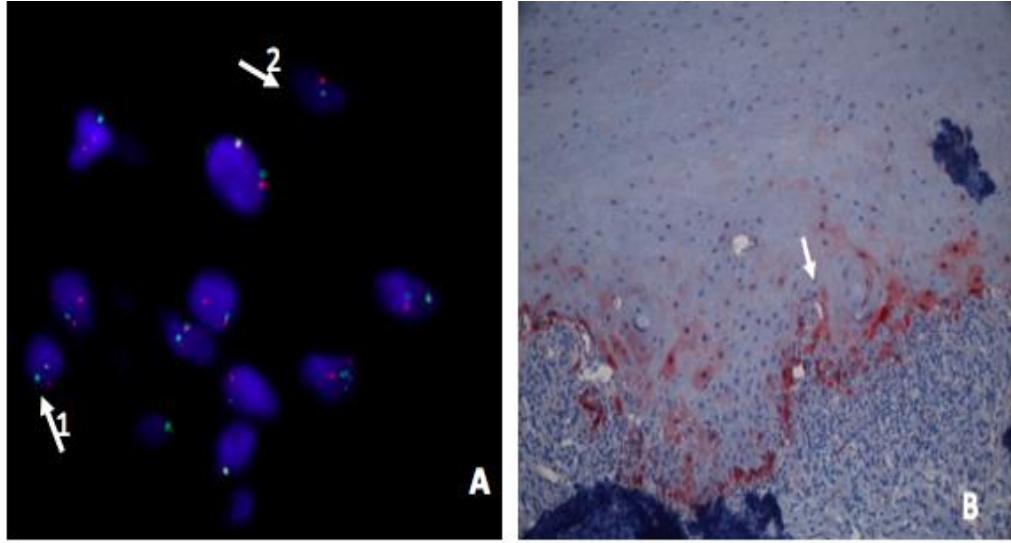
Spearman's korelasyon testi ile, her olgu grubu kendi içinde, p16 ekspresyon seviyeleri ve FISH bulgu sonuçlarına göre analiz edilmiştir. Bu analize göre; sadece OLP grubunda gözlenen trizomi ile p16 ekspresyon seviyesi anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4-11).

Tablo 4-11: Olgu gruplarının FISH ve IHC sonuçlarına göre korelasyon analizi

GRUP		N	Korelasyon Katsayısı	p
Dizomi/ p16 ekspresyonu	OLP	20	-0,414	0,070
	YEHK	20	0,263	0,263
	Sağlıklı	10	-	-
Monozomi/ p16 ekspresyonu	OLP	20	0,058	0,807
	YEHK	20	0,166	0,485
	Sağlıklı	10	-	-
Delesyon	Hemizigot del/ p16 ekspresyonu	OLP	0,102	0,668
		YEHK	-0,101	0,671
		Sağlıklı	-	-
	Homozigot del/ p16 ekspresyonu	OLP	-	-
		YEHK	0,127	0,594
		Sağlıklı	-	-
Trizomi/ p16 ekspresyonu	OLP	20	0,505	0,023*
	YEHK	20	-0,026	0,914
	Sağlıklı	10	-	-
Tetrazomi/ p16 ekspresyonu	OLP	20	-	-
	YEHK	20	0,272	0,246
	Sağlıklı	10	-	-
Amplifikasyon/ p16 ekspresyonu	OLP	20	0,153	0,518
	YEHK	20	-0,262	0,264
	Sağlıklı	10	-	-

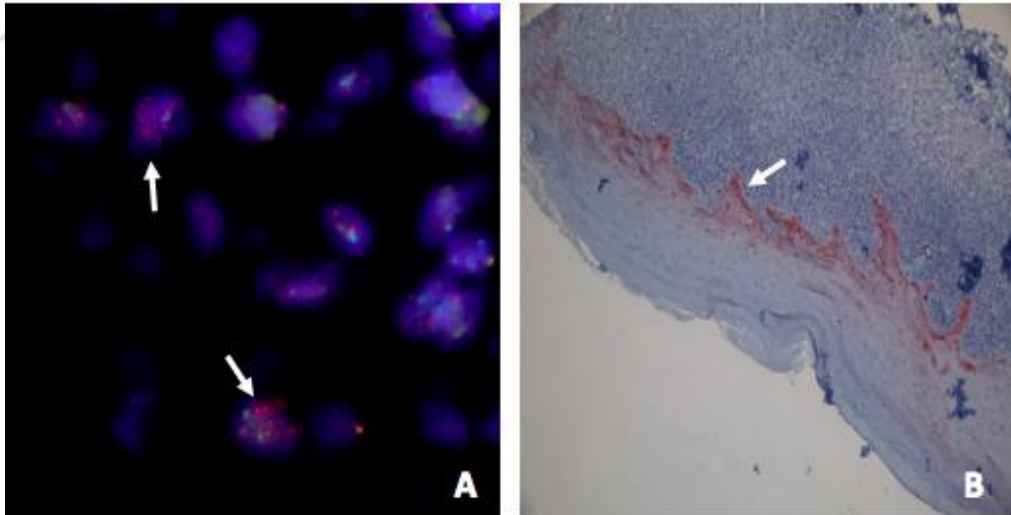
Spearman's test

* $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlıdır



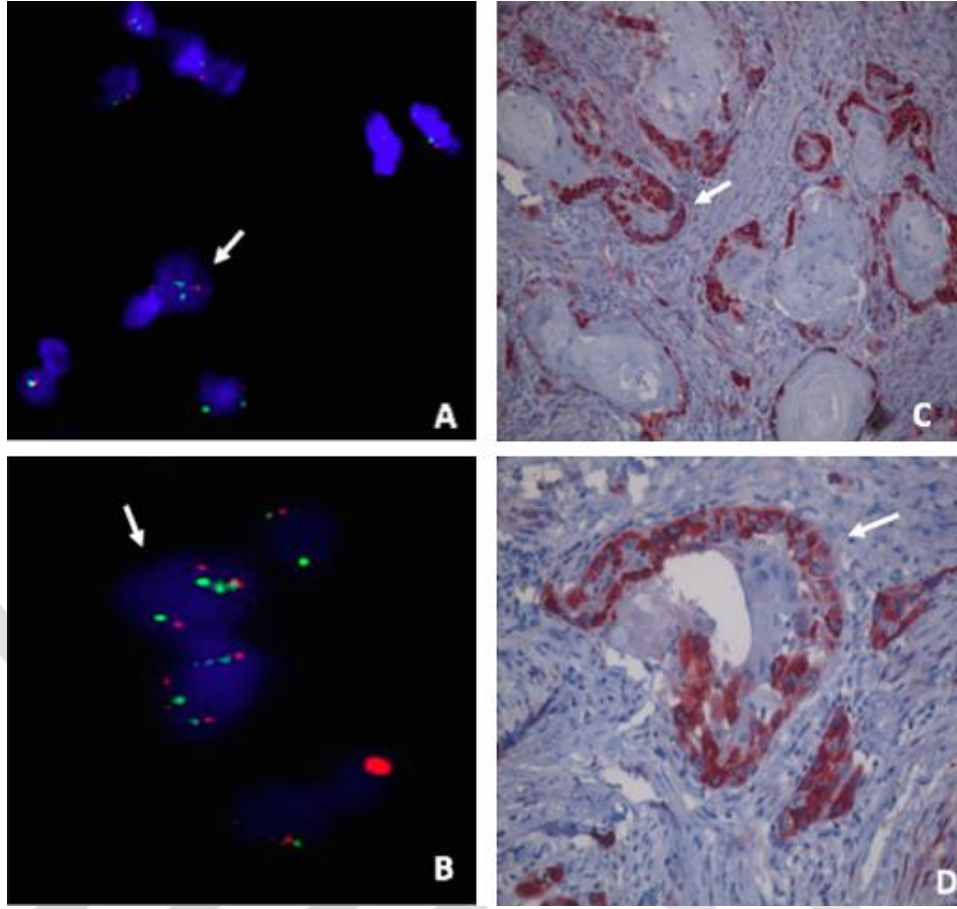
Şekil 4-3: Çalışma grubumuzdan OLP 2 olgusunun 9p21 için FISH ve IHC görüntüsü:

- A-1) 9p21 için hemizigot delesyon gözlenen bir nukleus.
 A-2) 9p21 için monozomi gözlenen bir nukleus.
 B) p16 primer antikoru ile pozitif 4+ boyanma gözlenen hücreler (x 200)



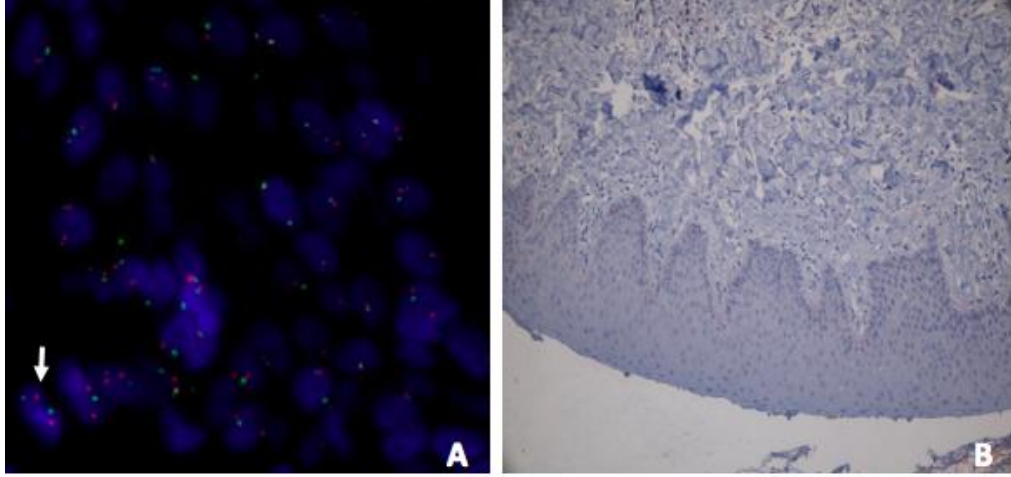
Şekil 4-4: Çalışma grubumuzdan OLP 16 olgusunun 9p21 için FISH ve IHC görüntüsü

- A) 9p21 için amplifikasyon gözlenen nukleuslar.
 B) p16 primer antikoru ile pozitif 4+ boyanma gözlenen hücreler (x 100)



Şekil 4-5: Pozitif kontrol grubundan YEHK 11 olgusunun FISH ve IHC görüntüsü:

- A) 9p21 için hemizigot delesyon gözlenen bir hücre.
- B) 9p21 için trizomi gözlenen bir hücre.
- C) p16 primer antikoruna pozitif 4+ boyanma gözlenen hücreler (x 200).
- D) p16 primer antikoruna pozitif 4+ boyanma gözlenen hücreler (x 400).



Şekil 4-6: Negatif kontrol grubundan sağlıklı 10 olgusunun FISH ve IHC görüntüsü.

A) 9p21 için dizomi (normal) gözlenen nukleuslar.

B) p16 primer antikoruna boyanma göstermeyen (negatif) hücreler (x 200).

5. TARTIŞMA

Oral liken planus, genel popülasyonun %1- 2'sini etkileyen, kronik inflamatuvar ağız mukoza hastalığıdır (1, 4). OLP'nin etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, liken planus için otoimmünite, immun yetmezliği, gıda alerjileri, alkol ve tütün kullanımı, stres, genetik yatkınlıklar, ilaç, tramva, bakteri, virüs, diyabet ve hipertansiyon etyolojik faktörlerden bazıları olarak kabul edilmektedir (6, 38).

OLP lezyonlarının, tekrarlayan karsinojen uyarılarla 10 ile 15 yıl içerisinde %0,5- 2,2 oranında malign transformasyon göstererek YEHK'ya dönüşümü rapor edilmiştir. Bu sebeple; OLP, WHO tarafından potansiyel malign bir hastalık olarak da sınıflandırılmıştır (2, 24, 30). YEHK'nın oluşum mekanizması; genetik ve epigenetik değişiklikler, heterozigote kaybı, metilasyon ile gen inaktivasyonu, gen amplifikasyonu ve nokta mutasyonu gibi çok basamaklı şekillerde gerçekleşmektedir (88, 89).

Yapılan çalışmalarda, baş boyun tümörlerinin yaklaşık %70'inde, 9p21 bölgesinde lokalize olan tümör baskılayıcı gen proteinleri p16^{INK4A} (CDKN2A) ve p15^{INK4B}'de heterozigote kaybı (LOH) olduğu bildirilmiştir. Genetik değişiklikler sonucunda inaktive olan p16 geni, hücre proliferasyonunun kontrolden çıkmasına ve tümörojeneze sebep olabilir. YEHK'da da p16 geninin sıklıkla değişime uğradığı belirtilmiştir (109, 110, 111, 112, 113). Ayrıca oral kavitenin primer tümörlerinde ve premalign lezyonlarında, p16^{INK4A} ekspresyon kaybının gözlemlendiği bildirilmiştir. p16 geni, Rb proteini tarafından transkripsiyonel baskılandığında, p16 mRNA ve proteini, Rb'nin eksik olduğu hücrelerde yüksek seviyede birikmektedir. Aynı zamanda, p16 mRNA ve proteininin birikimi; hücre yaşlanma, Ras'ın onkogenik hiperaktivitesi ve Rb'nin inaktivasyonu gibi durumlara bir yanıt olabileceğini düşündürmüştür (107, 116).

Çalışmamızda OLP ve YEHK olgularında, FISH yöntemiyle p16 gen değişiklikleri ve IHC yöntemiyle de p16 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Literatür araştırmasında, OLP ve YEHK olgularında, IHC ve moleküler genetik yöntemler ile p16 geninin ve protein seviyesinin incelendiği çalışmalar, FISH yöntemiyle p16 gen değişikliklerinin incelendiği çalışmalara göre daha fazladır. OLP ve YEHK olgularında p16'nın gen ve protein seviyelerindeki değişikliklerini incelemek için, FISH ve IHC

yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmaya literatür taramasında rastlanmamıştır. Bu nedenle, bizim çalışmamız özgün bir çalışma olarak değerlendirilebilir.

Bermejo-Fenoll ve ark.'nın 2009 yılında, 550 OLP olgusu ile yapmış oldukları retrospektif çalışmada, klinik olarak OLP tanısı almış olguların YEHK'ya malign dönüşümünü incelemiştir. Çalışmada bulunan olguların %23,3'ünü (n=128) erkek ve %76,7'sini (n=422) kadın olgu oluşturmaktadır ve olguların ortalama $24 \pm 20,83$ ay takip süresinde %0,9'unda malign transformasyon göstererek YEHK'ya dönüşümünü tespit etmişlerdir. Ancak OLP'nin malign transformasyon insidansının kesin olarak belirleniminin, dış risk faktörlerin etkisi nedeniyle, zor olduğunu belirtmişlerdir (80).

Yapılan çalışmaların çoğunda OLP'nin yaş aralığının en fazla 40-60 yaş olduğu ve yetişkin olgular içerisinde, kadınlarda erkeklerden yaklaşık 2 kat daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (1, 4, 38, 72, 79). Çalışmamız ile literatür sonuçları uyumlu olup, OLP olgularımızın yaşları 25 ile 75 arasında değişmektedir ve yaş ortalaması $51,6 \pm 13,5$ 'tir. Çalışma grubumuzda toplam 20 OLP olgusu içerisinde kadın olguların (n=14), erkek olgulara (n=6) oranı 2,33'tür.

Tovaru ve ark.'nın 2013 yılında, 633 OLP olgusu ile yapmış oldukları retrospektif çalışmada, olguların %78,67'sinin (n=498) kadın ve ortalama yaşlarının 52 olduğunu belirtilmiştir. Olguların çoğunda lezyon, yanak mukozasında, daha az sıklıkta dil, diş eti, dudak ve ağız tabanında, nadiren de damakta lokalize olduğu bildirilmiştir. Olguların %9,6'sında Hepatit C virüsünün pozitif olduğu ve %19'unda safra kesesi hastalığı (kolesistit, safra taşı gibi) ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Olguların %0,95'inde (n=6) ise malign transformasyon ile YEHK'ya dönüştüğü gözlenmiştir (79).

OLP, oral kavitenin çeşitli bölgelerinde görülmesine rağmen özellikle yanak mukozasında, dilin lateral kısımlarında, diş etinde sıklıkla gözlenmektedir (1, 5, 38, 79). Lokalizasyon dağılımına göre; çalışma grubumuzu oluşturan OLP olguları ile literatür sonuçları uyumlu olup, OLP olgularımızın %65'inde (n=13) yanak mukozasında, %5'inde (n=1) üst dudakta, %5'inde (n=1) ise dilde tutulum gösterdiği tespit edilmiştir. Olguların %20'sinde (n=4) yanak mukozasıyla birlikte dilde, %5'inde de (n=1) yanak mukozasıyla birlikte üst dudakta tutulum göstermektedir.

Weber ve ark.'nın 2003 yılında 50 BBYEHK'lı ve 42 pleomorfik adenomlu olgularda, 9p21 bölgesinde ile yapmış oldukları genetik ve epigenetik çalışmada; p14^{ARF}'nin promotor metilasyonu, BBYEHK'lı olguların %16'sında (n=8) saptanırken,

non neoplastik mukozanın hiç birinde gözlenmemiştir. BBYEHK olgularında p16^{INK4A}'nın metilasyon oranı %32 (n=16) olarak tespit edilmiştir. Tümör olgularının hiç birinde p16^{INK4A} ve p14^{ARF}'nin homozigot delesyonu tespit edilmemiştir. 50 BBYEHK'lı olgu grubunun %40'ında (n=20) p53 mutasyonu saptanmıştır. BBYEHK'lı olgularda p16^{INK4A}'nın metilasyonu, p53 mutasyonu gözlenen olgulara (%25) göre, p53 mutasyonu gözlenmeyen olgularda (%37) daha yüksektir. Benign pleomorfik adenomlarda, p14^{ARF}'nin promotor metilasyonu %2 (n=1) oranında gözlenirken, p16^{INK4A}'nın metilasyon oranı %29 (n=12) olarak saptanmıştır. Çalışmada, INK4A-ARF lokusunda saptanan değişimlerin, sadece karsinogenez mekanizması için değil, aynı zamanda benign tümörler için de önemli bir belirteç olduğunu belirtmişlerdir. (113).

Zahao ve ark.'nın, 1999 yılında 65 primer maksillofasiyal YEHK'lu olguda p16 ve p15 genleri ile yapmış oldukları çalışmada, olguların hiç birinde p16 ve p15 geninde homozigot delesyon saptamamışlardır. Olguların %34'ünde (n=22) p16 geninin 5'CpG adacığının metilasyonu, %12'sinde (n=8) p15 geninin metilasyonu ve sadece 4 YEHK'lı olguda ise p16 ve p15 genlerinin her ikisinde de metillenme tespit etmişlerdir. Çalışmada, rastgele seçilen 27 YEHK'lı olgunun %37'si (n=10) pozitif p16 ekspresyonu, %67'si ise (n=17) negatif p16 ekspresyonu göstermiştir. Pozitif immunreaktivite gösteren 10 olgunun aynı zamanda, p16 geninin 5'CpG adacığının metillendiği ve p16 için negatif boyanma gözlenen 3 olgunun p16 geninde mutasyon tespit etmişlerdir. Negatif boyanma gözlenen 4 olguda ise hiç bir genetik değişiklik gözlememişlerdir. Çalışmada, maksillofasiyal YEHK'lu olgularda p16 geninde mutasyon ya da 5'CpG adacığının metilasyonu ile oluşan inaktivasyon mekanizmalarının, p15 gene göre daha fazla gözlendiğini ve p15 geninin bu kanser türlerinin gelişiminde daha az rol oynadığını belirtmişlerdir (109). Çalışmamızda, FISH yöntemiyle incelediğimiz 20 YEHK'lı olgu grubumuzun %10'unda (n=2) homozigot delesyon tespit edilmiştir. IHC yöntemiyle ise, p16 ekspresyon seviyelerini incelediğimiz 20 YEHK'lı olgunun, %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) da pozitif 4+ oranlarında boyanma gözlenmiştir. YEHK olgularımızda, IHC yöntemiyle incelediğimiz p16 ekspresyon seviyeleri ve FISH yöntemiyle tespit ettiğimiz anomaliler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamız Zahao ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmadan farklılık göstermektedir.

Uzawa ve ark.'nın 2007 yılında, FISH tekniğini kullanarak, 57 YEHK'lu olguda siklin D1 (CCND1) ve p16 genlerindeki genomik değişiklikleri inceledikleri çalışmada; olguların %49'unda (n=28) CCND1 geninde sayısal anomali ve bu anomali saptanan 28 olgunun 19'unda amplifikasyon, 9'unda 11. kromozomun polizomisini tespit etmişlerdir. 57 YEHK'lu olgunun %39'unda (n=22) p16 delesyonu saptamışlardır. İstatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, p16 delesyonu gözlenen olguların hayatta kalma oranlarının (p=0,0516), p16 delesyonu gözlenmeyen olgulara göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (p=0,1878). IHC tekniği ile p16 delesyonu gözlenen (n=22) 10 YEHK'lu olgunun p16 ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. 10 YEHK'lu olgunun %80'inde (n=8) p16 protein ekspresyon kaybını, 2 YEHK'lu olguda ise düşük oranda p16 protein ekspresyonunu gözlemişlerdir. CCND1 sayısal anomali saptanan olgularda gözlenen p16 delesyonunun, önemli ölçüde kötü prognozdan bağımsız sağkalım (p=0,0002) ve tam sağkalımı sağladığını belirtmişlerdir (p=0,0153). CCND1 geninin sayısal anomalisinin, agresif tümörün iyi bir belirleyicisi olmasına rağmen, YEHK'lu olgularda nüks ve kötü prognozu temsil ettiğini belirtmişlerdir (120). Çalışmamızda, 20 YEHK'lu olgumuzun %65'inde (n=13) hemizigot delesyon, %10'unda (n=2) homozigot delesyon tespit edilmiştir. Bununla birlikte, YEHK'lı olgularımızın, %85'inde (n=17) monozomi, %40'ında (n=8) trizomi, %15'inde (n=3) tetrazomi ve %25'inde (n=5) amplifikasyon gözlenmiştir. Ayrıca, 20 YEHK'lı olgumuzun, %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) da pozitif 4+ oranlarında p16 ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. YEHK'lu olgularımızda IHC tekniği ile incelediğimiz p16 ekspresyon seviyeleri ve FISH tekniği ile tespit ettiğimiz anomaliler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamız Uzawa ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmadan farklılık göstermektedir. Delesyon gözlenen olgularda artmış ekspresyon seviyelerini, karsinogenez mekanizmasında p16 geni ile birlikte rol alan, Rb genin kontrol mekanizmasının deregülasyonu sonucu olduğunu düşünmekteyiz (108).

Ohta ve ark.'nın, 2009 yılında 44 oral YEHK'lı olgu grubunda, p16 ve p14 genleri ile yaptıkları çalışmada; %61,4'ünde (n=27) p16 mRNA ekspresyon ve %22,7'sinde (n=10) p14 mRNA ekspresyonu değişimleri saptanmıştır. YEHK olguların %63,6'sında (n=28) p16 geninin metilasyonu, %68,2'sinde (n=30) 9p21 lokusunda heterozigosite kaybı (LOH) tespit edilmiştir. Olguların %9'unda (n=4) p16 gen mutasyonu, %4,5'inde (n=2) p14 gen mutasyonu ve %20,5'inde (n=9) homozigot

delesyon bulunmuştur. Ohta ve ark. yapmış oldukları bu çalışmada, sadece 1 olgu hariç, diğer tüm olgularda %97,7 oranında p16 ve p14 gen lokuslarında değişiklik tespit etmişlerdir (110).

Kim ve ark.'nın 2001 yılında, kromozom in situ hibridizasyon (CISH) tekniği kullanarak, 15 OLP, 2 likenoid displazi (LD) ve 2 YEHK olgusunda interfaz CISH çalışmasında; OLP olgularının lenfositlerine kıyasla mukoza epitelinde, 9. kromozomda monozomi ve polizomi oranlarının artmış olduğunu belirtmişlerdir ($p=0,0017$, $p=0,0054$). 2 LD olgusunda 9. kromozom polizomi görülme oranlarının %15,38-22,58 arasında olduğunu ve LD olgularından malign transformasyon gösteren 2 YEHK'li olguda, 9. kromozom monozomi oranının %70'den fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada, LD olgularının 9. kromozom monozomisinin, olası malign transformasyon gelişiminde önemli bir rolü olabileceğini öne sürmüşlerdir (86). Çalışmamızda, FISH tekniği ile incelediğimiz 20 OLP'li olgunun, %100'ünde ($n=20$) monozomi, %65'inde ($n=13$) hemizigot delesyon, %35'inde ($n=7$) trizomi, %30'unda ($n=6$) ise amplifikasyon gözlenirken, OLP'li olguların hiç birinde homozigot delesyon ve tetrazomi gözlenmemiştir. 20 YEHK'li olgumuzun ise, %85'inde ($n=17$) monozomi, %65'inde ($n=13$) hemizigot delesyon, %10'unda ($n=2$) homozigot delesyon, %40'ında ($n=8$) trizomi, %15'inde ($n=3$) tetrazomi ve %25'inde ($n=5$) amplifikasyon tespit edilmiştir. FISH tekniği ile OLP'li ve YEHK'li olgularımızda incelediğimiz p16 genindeki anomaliler göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamız Kim ve ark.'nın yapmış oldukları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Chen ve ark.'nın 2012 yılında, IHC tekniği ile ,165 oral YEHK'li olguya p16^{INK4A} ekspresyon analizi ile yapmış oldukları çalışmada, betel quid kullanan ve kullanmayan olgulardaki p16 ekspresyon seviyesinin benzer olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, nodül metastaz ile p16^{INK4A} ekspresyonunun anlamlı bir benzerliğinin bulunmadığını bildirmişlerdir ($p=0,005$). p16 ekspresyon kaybının daha fazla sıklıkta T evrelemede olduğunu, ancak bu durumun sadece lenf nodu metastazı olmayan olgularda gözlemlendiğini tespit etmişlerdir ($p=0,059$). Betel quid çiğneyen olgularda kötü prognoz ve nüksün daha fazla olmasına rağmen, çalışmada p16^{INK4A} ekspresyonu ile betel quid arasında bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmada Tayvan popülasyonunda, YEHK gelişiminde nüks ve hayatta kalım açısından, p16^{INK4A}'nın downregülasyonunun önemli bir belirteç olduğunu belirtmişlerdir (63).

Okami ve ark.'nın, 1999 yılında 23 primer BBYEHK'lı olguda, IHC tekniği ile p16 inaktivasyonu ve pRb ekspresyonunu ve FISH tekniği ile siklin D₁ amplifikasyonunu inceledikleri çalışmada; olguların %83'ünde (n=19) p16 inaktivasyonu, %9'unda (n=2) pRb inaktivasyonu saptamışlardır ve %36'sında (n=4) siklin D₁ amplifikasyonu tespit etmişlerdir. BBYEHK'lı olguların %91'inde p16/ siklin D₁/ Rb yolağından en az bir tanesinde değişiklik olduğunu saptamışlardır. Çalışmada, BBYEHK olgularda, p16 ve Rb'deki genetik değişikliklerin önemli bir yeri olmasıyla birlikte, siklin D₁ amplifikasyonunun oluşması ve aynı zamanda p16 kaybının da gözlenmesi, siklin D₁ amplifikasyonunun özel bir rolü olduğunu düşündürmüştür (112). Çalışmamızda, 20 YEHK'lı olgumuzun, %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) da pozitif 4+ oranlarında boyanma tespit edilmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözleendiği için, mukozaların %100'ü (n=10) negatif olarak değerlendirilmiştir. IHC tekniği ile YEHK'lı olgulardada ve normal mukozalarda incelediğimiz p16 eksresyon seviyeleri göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamız Okami ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmadan farklılık göstermektedir.

Nakahara ve ark.'nın, 2000 yılında, IHC yöntemiyle 78 YEHK, 46 lökoplaki, 20 normal mukoza ve 30 tümöre komşu epitelde, Rb geni, siklin D₁ ve p16^{INK4A} proteinini incelemek için yaptıkları çalışmada, tüm normal mukoza ve lökoplaki olgularının çoğunda Rb ve p16 ekspresyonunu saptamışlardır. Tümöre komşu epitelin, %43,4'ünde Rb ve %40'ında p16 ekspresyon kaybını gözlemişlerdir. YEHK'lı olgularda ise, %56,4'ünde Rb ve %67,9'unda p16 ekspresyon kaybını tespit etmişlerdir. Siklin D₁'in overekspresyonu normal mukozada gözlenmezken, YEHK'lı olguların %35,9'unda tespit edilmiştir. YEHK olgularının, Rb yolağındaki değişikliklerden en az bir tanesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Nakahara ve ark. yapmış oldukları çalışmada, YEHK olgularında, p16/pRb proteinleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmişlerdir (p<0,001). 78 YEHK olgusu arasında 1 olguda (%1,3) p16⁺/pRb⁺, 24 olguda (%30,8) p16⁺/pRb⁻, 33 olguda (%42,3) p16⁻/pRb⁺ ve 20 olguda (%25,6) p16⁻/pRb⁻ ilişkisi tespit etmişlerdir (111). Çalışmamızda, 20 YEHK'lı olgumuzun, %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) da pozitif 4+ oranlarında p16 ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözleendiği için, mukozaların %100'ü (n=10) negatif olarak değerlendirilmiştir. IHC tekniği ile incelediğimiz 20 YEHK'lı olgunun ve 10 normal

mukozanın p16 ekspresyon seviyeleri ile, Nakahara ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmadaki p16 ekspresyon oranları farklılık göstermektedir.

Montebugnoli ve ark.'nın, 2011 yılında IHC tekniğiyle, OLP olgularında p16^{INK4a} protein ekspresyonunu incelemek için yapmış oldukları çalışmada; 56 OLP olgusu ve 12 ilhiapsız oral lökoplaki (OLK), 24 kronik iltihaplı OLK, toplam 36 OLK olgusuna karşı, 23 reaktif spesifik olmayan ihihaplı olgu ve 14 normal kontrol olguları çalışma grupları olarak belirlenmiştir. Çalışmada, normal kontrol olgularının tümü negatif p16^{INK4a} olarak belirlenmiştir. OLP olguların %64'ünde ve OLK olgularının %28'inde pozitif p16^{INK4a} olarak tespit edilmiştir. Ancak OLP ile reaktif spesifik olmayan iltihap grubu (%43) arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu sebeple, OLP olgularında pozitif p16^{INK4a} gözlenmesinin, YEHK'a dönüşme riskinden ziyade inflamatuvar süreçle alakalı olabileceğini belirtmişlerdir (118). Çalışmamızda, 20 OLP olgumuzun %5'inde (n=1) pozitif 1+, %10'unda (n=2) pozitif 2+, %45'inde (n=9) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) pozitif 4+ oranlarında boyanma gözlenmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözlendiği için, mukozaların %100'ü (n=10) negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda IHC tekniği ile incelediğimiz 20 OLP'li olgunun ve 10 normal mukozanın p16 ekspresyon seviyeleri ile, Monetbugnoli ve ark.'nın yapmış oldukları çalışma benzerlik göstermektedir.

Salehinejad ve ark.'nın 2014 yılında, IHC tekniği ile, 45 YEHK, 15 displazisiz OLP ve 8 normal mukozada, p16 ekspresyon seviyelerini inceledikleri çalışmada, tüm normal mukoza ve YEHK'lu olgularda negatif immunreaktivite gözlenirken, OLP olgularının %26,7'sinde (n=4) pozitif p16 (immunreaktivite >%70) saptanmıştır. Negatif p16 saptanan 5 OLP olgusunda %10'dan daha az oranda immunreaktivite gözlemişlerdir. Salehinejad ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada, OLP ile YEHK olgu grupları arasında istatistiksel bir fark bulmuşlardır (p=0,03). Bu sebepten dolayı, p16 ekspresyon seviyesi incelemesinin, OLP olguları için mailgniteye dönüşüm çalışmalarında bir marker olarak kullanılamayacağını öne sürmüşlerdir (11). Çalışmamızda 20 OLP'li olgumuzun %5'inde (n=1) pozitif 1+, %10'unda (n=2) pozitif 2+, %45'inde (n=9) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) pozitif 4+ boyanma gözlenmiştir. 20 YEHK'lu olgumuzun %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) de pozitif 4+ boyanma tespit edilmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözlendiği için, mukozaların %100'ü (n=10) negatif olarak

değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, Salehinejad ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmanın aksine, OLP ile YEHK olgu grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p>0,05$).

Poomsawat ve ark.'nın, 2011 yılında 23 OLP'li olguda ve 10 normal mukozada, CDK4, CDK6 ve p16 proteinlerinin ekspresyon seviyelerini inceledikleri çalışmada; OLP olgularının %78,26'sında ($n=18$) pozitif CDK4 ve %65,22'sinde ($n=15$) pozitif p16 ekspresyonu tespit edilmiştir. OLP olgularının daha düşük oranla, %34,78'inde ($n=8$) ise pozitif CDK6 ekspresyonu saptanmıştır. 10 normal mukozanın %100'ünde ($n=10$) negatif p16 gözlenirken, %10'unda ($n=1$) pozitif CDK6 ve %30'unda ($n=3$) da pozitif CDK4 tespit edilmiştir. Çalışmada saptanan, CDK4 ve p16'nın overekspresyonu, OLP olgularında olası malign dönüşümü için bir kanıt olabileceği düşünülmüştür (117). Çalışmamızda 20 OLP'li olgumuzun %5'inde ($n=1$) pozitif 1+, %10'unda ($n=2$) pozitif 2+, %45'inde ($n=9$) pozitif 3+ ve %40'ında ($n=8$) pozitif 4+ oranlarında p16 ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözlemlendiği için, mukozaların %100'ü ($n=10$) negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, IHC tekniği ile, 20 OLP'li olguda ve 10 normal mukozada incelediğimiz p16 ekspresyon seviyeleri ile, Poomsawat ve ark.'nın yapmış oldukları çalışma benzerlik göstermektedir.

Pande ve ark.'nın 1998 yılında, IHC tekniği kullanarak, 35 YEHK, 22 lökoplaki ve 30 normal mukoza olgularında pRb ve p16 protein ekspresyon seviyelerini inceledikleri çalışmada, YEHK olgularının %66'sında ($n=23$) ve lökoplaki olgularının %64'ünde ($n=12$) pRb ekspresyon kaybını tespit etmişlerdir. YEHK olguların %63'ünde ($n=22$) ve lökoplaki olgularının %59'unda ($n=13$) p16 ekspresyon kaybını tespit etmişlerdir. Normal mukoza olgularında ise pRb ve p16 ekspresyonun düşük oranda boyandığını gözlemişlerdir. Pande ve ark. yapmış oldukları çalışmada, YEHK ve lökoplaki olgularında, p16/pRb proteinleri arasında güçlü bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. 35 YEHK olguları arasında 2 olguda $p16^+/pRb^+$, 11 olguda $p16^+/pRb^-$, 10 olguda $p16^-/pRb^+$ ve 12 olguda $p16^-/pRb^-$ ilişkisi tespit edilmiştir ($p=0,007$). 22 lökoplaki olgusunun, birinde $p16^+/pRb^+$, 8'inde $p16^+/pRb^-$, 7'sinde $p16^-/pRb^+$ ve 6 olguda da $p16^-/pRb^-$ tespit edilmiştir ($p=0,0052$) (114). Çalışmamızda, 20 OLP olgumuzun %5'inde ($n=1$) pozitif 1+, %10'unda ($n=2$) pozitif 2+, %45'inde ($n=9$) pozitif 3+ ve %40'ında ($n=8$) pozitif 4+ oranlarında p16 ekspresyon seviyelerini tespit

edilmiştir. 20 YEHK olgumuzun %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) de pozitif 4+ oranlarında boyanma gözlenmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözlendiği için, mukozaların %100'ü (n=10) negatif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda OLP ile YEHK olgu grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir ($p>0,05$). IHC tekniği ile 20 OLP, 20 YEHK ve 10 normal mukozada, incelediğimiz p16 ekspresyon seviyeleri göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamız Pande ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmadan farklılık göstermektedir.

Goel ve ark.'nın 2015 yılında, IHC tekniği kullanarak 60 OLP olgusunda CDK4 ve p16 ekspresyon seviyelerini analiz ettikleri çalışmada; OLP olgularının, normal mukozaya göre, %80'inde (n=48) %19,6 oranında artmış CDK4 ve olguların %63,3'ünde (n=41) %16,4 oranında artmış p16 ekspresyonunu tespit etmişlerdir. Çalışmanın pozitif kontrol grubunu oluşturan 10 YEHK'li olgunun, %100'ünde (n=10) %74 oranında artmış CDK4 ve %100'ünde (n=10) %80,9 oranında artmış p16 ekspresyonu tespit etmişlerdir. Çalışmanın negatif kontrol grubunu oluşturan 10 normal mukozanın %100'ünde (n=10) negatif p16 ve CDK4 saptamışlardır. Bu çalışmaya göre, OLP lezyonlarında artmış CDK4 ve p16'nın sitoplazmik ekspresyonu, OLP'nin olası malign durumu hakkında bilgi verebileceğini düşündürmüştür (119). Çalışmamızda 20 OLP olgumuzun %5'inde (n=1) pozitif 1+ , %10'unda (n=2) pozitif 2+ , %45'inde (n=9) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) pozitif 4+ oranlarında boyanma gözlenirken, 20 YEHK'li olgumuzun; %25'inde (n=5) pozitif 2+, %35'inde (n=7) pozitif 3+ ve %40'ında (n=8) de pozitif 4+ oranlarında boyanma gözlenmiştir. 10 normal mukozada %5'ten daha az oranda boyanma gözlendiği için, mukozaların %100'ü (n=10) negatif olarak değerlendirilmiştir. OLP ile YEHK olgu gruplarımız arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmediğinden ($p>0,05$) dolayı, çalışmamız Goel ve ark.'nın yapmış oldukları çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda FISH ve IHC tekniği ile incelediğimiz, OLP'li olgu grubumuz ile YEHK'lu olgu grubumuz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir benzerlik bulunmuştur. Çalışmamız, son zamanlarda yayınlanan literatür sonuçları ile uyumlu olup, premalign lezyon sınıfından olan OLP'nin, p16 geninde gözlenen değişimlerin olası malign dönüşümünde önemli bir faktör olabileceğini düşündürmüştür. Karsinogenez mekanizmasında değişikliğe uğrayan p16 geninin, OLP

üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve diğer moleküllerle olan ilişkisinin araştırılması için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- 1) Parashar P. Oral lichen planus. *Otolaryngol Clin North Am.* 2011; **44**: 89-107.
- 2) Mignogma M.D., Fedele S., Lo Russo L. ve ark. Field cancerization in oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol.* 2007; **33**: 383-389.
- 3) Silverman S Jr., Gorsky M., Lozada-Nur F. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission and malignant association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; **60**: 30-34.
- 4) Shen Z.Y., Liu W., Zhu L.K. ve ark. A retrospective clinopathological study on oral lichen planus and malignant transformation: analysis of 518 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Buccal.* 2012; **17**: 943-947.
- 5) Ebrahimi M., Nylander K., van der Waal I., Ebrahimi M. Oral lichen planus and the p53 family: what do we know?. *J Oral Pathol Med.* 2011; **40**: 281-285.
- 6) Varghese S.S., George G.B., Sarojini S.B. ve ark. Epidemiology of oral lichen planus in a cohort of South Indian population: a retrospective study. *Journal of Cancer Prevention.* 2016; **21**: 55-59.
- 7) Seoane J., Romero M.A., Centelles P.V., ve ark. Oral lichen planus a clinical and morphometric study of oral lesions in relation to clinical presentation. *Braz Dent J.* 2004; **15**: 9-12.
- 8) Petersen P.E. World Health Organization global policy for improvement of oral health- World Health Assembly 2007. *International Dental Journal.* 2008; **58**: 115-121.
- 9) Kumar V., Cotran R.S, Robbins S.L. *Basic Pathology.* 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. 132-174.
- 10) Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 2008; **9**: 51-61.
- 11) Salehinejad J., Sharifi N., Amirchaghmaghi M., ve ark. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. *Annals of Diagnostic Pathology.* 2014; **18**: 210-213.
- 12) Buajebe W., Poomsawat S., Punyasingh J., ve ark., Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med.* 2009; **38**: 104-108.
- 13) Tanaka T., Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *Journal of Oncology.* 2011; **2011**: 1-10.

- 14) Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology*. 2005; **32**: 59-66.
- 15) Leemans C.R., Braakhuis B.J.M., Brakenhoff R.H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Review*. 2011; **11**: 9-22.
- 16) Jefferies S., Foulkes W.D. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology*. 2001; **37**: 115-126.
- 17) Eryılmaz K., Tatar A., Uslu C., ve ark. Baş Boyun Yassı Hücreli Kanserlerinde Sitogenetik Çalışmalar. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; **34**: 55-60.
- 18) Avramut M., Gollin S.M. İçinde Heim S., Mitelman F., editor. *Cancer Cytogenetics*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc; 2009. p.p. 375-413
- 19) Califano J., van der Riet P., Westra W. ve ark. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996; **56**: 2488-2492.
- 20) Scully C., Field J.K., Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncology*. 2000; **36**: 311-327.
- 21) Stadler M.E., Patel M.R., Couch M.E. ve ark. Molecular biology of head neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2008; **22**: 1099-1124.
- 22) Sturgis E.M., Wei Q. İçinde Werning J. *Oral Cancer Diagnosis, Management and Rehabilitation*. New York: Thieme Medical Publishers, Inc; 20007. p.p. 1-7.
- 23) Simard E.P., Torre L.A., Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncology*. 2014; **50**: 387-403.
- 24) Katsanos K.H., Roda G., Brygo A. ve ark. Oral Cancer and Oral Precancerous Lesions in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2015; **9**: 1043-1052.
- 25) Van der Waal I. Potentially malignant disorders of oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009; **45**: 317-323.
- 26) Warnakulasuriya S., Johnson N.W., Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007; **36**: 575-580.

- 27) Scheifele C., Reichart P.A., Dietrich T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2003; **39**: 619-625.
- 28) Lopez-Lopez J., Omana-Cepeda C., Jane-Salas E. Oral precancer and cancer. *Med Clin (Barc).* 2015; **145** (9): 404-408.
- 29) Neville B.W., Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; **52** (4): 195-215.
- 30) Olson M.A., Rogers R.S., Bruce A.J., Oral lichen planus, *Clinics in Dermatology.* 2016; **34** (4): 495-504.
- 31) Mankapure P.K., Humbe J.G., Mandale M.S. ve ark. Clinical profile of 108 cases of oral lichen planus. *Journal of Oral Science.* 2016; **58** (1): 43-47.
- 32) Sagari S., Sanadhya S., Doddamani M. ve ark. Molecular markers in oral lichen planus: a systematic review. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* 2016; **20** (1): 115-121.
- 33) Alrashdan M.S., Cirillo N., McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Arch Dermatol Res.* 2016; **8**: 539-551.
- 34) Tokman B., Sengüven B., Demir C. 99 vakalık seride oral liken planusun kliniko-patolojik korelasyonun değerlendirilmesi. *Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 2009; **26** (1): 1-6.
- 35) Gillenwater A. İçinde Werning J. *Oral Cancer Diagnosis, Management and Rehabilitation.* New York: Thieme Medical Publishers, Inc; 20007. p.p. 31-37.
- 36) Orlando B., Bragazzi N., Nicolini C. Bioinformatics and systems biology analysis of genes network involved in OLP pathogenesis. *Archives of Oral Biology.* 2013; **58**: 664-673.
- 37) Montebugnoli L., Farnedi A., Marchetti C. ve ark. High proliferative activity and chromosomal instability in oral lichen planus. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery.* 2006; **35**: 1140-1144.
- 38) Nogueira P.A., Carneiro S., Ramos-e-Silva M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. *International Journal of Dermatology.* 2015; **54**: 1005-1010.
- 39) Kumar S Hiremath S., Kale A.D., Hallikerimath S. Clinico-pathological study to evaluate oral lichen planus for the establishment of clinical and histopathological diagnostic criteria. *Turkish Journal of Pathology.* 2015; **31**: 24-29.

- 40) Van der Meij E.H., Van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med.* 2003; **32**: 507-512.
- 41) Ismail S.B., Kumar S.K.S., Zain R.B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *Journal of Oral Science.* 2007; **49** (2): 89-106.
- 42) Pandhi D., Signal a., Bhattacharya S.N. Lichen planus in childhood: a series of 316 patients. *Pediatric Dermatology.* 2014; **31** (1): 59-67.
- 43) Sugerman P.B., Savage N.W., Walsh L.J. ve ark. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; **13** (4): 350-365.
- 44) Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2000; **38**: 370-377.
- 45) Shklar G. Lichen planus as an oral ulcerative disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1972; **33**: 376–388.
- 46) Carrozzo M., Thorpe R. Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol.* 2009; **58**: 519-537.
- 47) Lodi G., Scully C., Carozzo M. ve ark. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radioal Endod.* 2005; **100**: 164-178.
- 48) Shirasuna K. Oral lichen planus: Malignant potential and diagnosis. *Oral Science International.* 2014; **11**: 1-7.
- 49) Nagao Y., Sata M. A retrospective case-control study of hepatitis C virus infection and oral lichen planus in Japan: association study with mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus. *BMC Gastroenterology.* 2012; **10**: 12-31.
- 50) Chung C.H., Yang Y.H., Chang T.T., ve ark. Relationship of oral lichen planus to hepatitis C virus in southern Taiwan. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences.* 2004; **20**: 151-159.
- 51) Mahboob A., Haroon T.S., Iqbal Z., ve ark. Frequency of anti-HCV antibodies in patients with lichen planus. *Journal of College of Physicians and Surgeons Pakistan.* 2003; **13**: 248-251.

- 52) Erkek E., Bozdogan O., Olut A.I. Hepatitis C. virus infection prevalence in lichen planus: examination of lesional and normal skin of hepatitis C virus-infected patients with lichen planus for the presence of hepatitis C virus RNA. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2001; **26**: 540-544.
- 53) Kirtak N., Inaloz H.S., Ozgoztasi Erbagci Z. The prevalence of hepatitis C virus infection in patients with lichen planus in Gaziantep region of Turkey. *European Journal of Epidemiology*. 2001; **16**: 1159-1161.
- 54) Denli Y.G., Durdu M., Karakas M. Diabetes and hepatitis frequency in 140 lichen planus cases in Cukurova region. *Journal of Dermatology*. 2004; **31**: 293-298.
- 55) Harman M., Akdeniz S., Dursun M. ve ark. Lichen planus and hepatitis C virus infection: an epidemiologic study. *International Journal of Clinical Practice*. 2004; **58**: 1118–1119.
- 56) Karavelioglu D., Koytak E.S., Bozkaya H. ve ark Lichen planus and HCV infection in Turkish patients. *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2004; **15**: 133–136.
- 57) Payers M.R., Cherubini K., Figueiredo M.A. ve ark. Oral lichen planus: focus on etiopathogenesis. *Archives of Oral Biology*. 2013; **58**:1057-1069.
- 58) Grinspan D., Diaz J., Villapol L.O. ve ark. Lichen ruber planus de la muquese buccale, sone association a un diabete. *Bull Soc Franc Derm Syph*. 1966; **73**: 898-899.
- 59) Lamey P.J., Gibson J., Barclay S.C. ve ark. Grinspan's syndrome: a drug-induced phenomenon? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990; **70**: 184-185.
- 60) Petrou-Amerikanou C., Markopoulos A.K., Belazi M. ve ark. Prevalence of oral lichen planus in diabetes mellitus according to the type of diabetes. *Oral Diseases*. 1998; **4**: 37-40.
- 61) Kurago Z.B. Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: an overview. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology*. 2016; **122**: 72-80.
- 62) Petersen P.E. Tobacco and Oral Health- the Role of the World Health Organization. *Oral Health Prev Dent*. 2003; **1** (4): 309-315.

- 63) Chen Y.W., Kao S.Y., Yang M.H. Analysis of p16^{INK4A} expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: prognostic correlation without relevance to betel-quid consumption. *Journal of Surgical Oncology*. 2012; **106**: 149-154.
- 64) Daftary D.K., Bhonsle R.B., Murti R.B. ve ark. An oral lichen planus-like lesion in Indian betel-tobacco chewers. *Scand J Dent Res*. 1980; **88**: 244-249.
- 65) Zain R.B., Ikeda N., Gupta P.C. ve ark. Oral mucosal lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits: consensus from a workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia. *J Oral Pathol Med*. 1999; **28**: 1-4.
- 66) Ktosek S.K., Sporny S., Stasikowska-Kanicka O. ve ark. Cigarette smoking induces overexpression of c-Met receptor in microvessels of oral lichen planus. *Arch Med Sci*. 2011; **7** (4): 706-712.
- 67) Neumann-Jensen B., Holmstrup P., Pindborg J.J. Smoking habits of 611 patients with oral lichen planus. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 1977; **43**: 410-415.
- 68) Gorsky M., Epstein J.B., Hasson-Kanfi H. ve ark. Smoking habits among patients diagnosed with oral lichen planus. *Tobacco Induced Diseases*. 2004; **2** (2): 103-108.
- 69) Reidy J., McHugh E., Stassen L.F.A. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon*. 2011; **9**: 278-283.
- 70) Morse D.E., Katz R.V., Pendrys D.G. ve ark. Mouthwash use and denatures in relation to oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology*. 1997; **33**: 338-343.
- 71) Yap T., McCullough M. Oral medicine and the ageing population. *Australian Dental Journal*. 2015; **60** (1): 44-53.
- 72) Werneck J.T., Costa T.O., Stibich C.A. ve ark. Oral lichen planus: study of 21 cases. *An Bras Dermatol*. 2015; **90**: 321-326.
- 73) Weston G., Payette M. Update on lichen planus and its clinical variants. *International Journal of Women's Dermatology*. 2015; **1**: 140-149.
- 74) Yardimci G., Kutlubay Z., Engin B. ve ark. Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases*. 2014; **2** (12): 866-872.
- 75) Edwards P.C., Kelsch R. Oral lichen planus: clinical presentation and management. *J Can Dent Assoc* 2002; **68** (8): 494-499.

- 76) Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 1999; **88** : 431-436.
- 77) Pelisse M. The vulvo-vaginal-gingival syndrome: a new form of erosive lichen planus. *Int J Dermatol*. 1989; **28**: 381-384.
- 78) Neville B.D., Damm D.d., Allen C.M., Bouquot J.E. *Oral and Maxillofacial pathology*. 3rd ed. China: Saunders Elsevier; 2009. p.p. 741-803.
- 79) Tovar S., Parlatescu I., Gheorge C. ve ark. Oral lichen planus: Aretrospective study of 633 patients from Bucharest, Romania. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; **18**: 201-206.
- 80) Bermejo-Fenoll A., Sanchez-Siles M., López-Jornet P. ve ark. Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncology*. 2009; **45**: 54-56.
- 81) Lauritano D., Arrica M., Lucchese A. ve ark. Oral lichen planus clinical characteristics in Italian patients: a retrospective analysis. *Head and Face Medicine*. 2016; **12**: 1-6.
- 82) Bektaş-Kayhan K., Ünür M. Ağız boşluğunda görülen kanserler ve sınıflandırılması. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2011; **45** (1): 55-63.
- 83) Greer R.O., Pathology of Malignant and Premalignant Oral Epithelial Lesions. *Otolaryngol Clin N Am*. 2006; **39**: 249-275.
- 84) Rand Torske K. İçinde Werning J. *Oral Cancer Diagnosis, Management and Rehabilitation*. New York: Thieme Medical Publishers, Inc; 20007. p.p. 18-30.
- 85) Malik U.U., Zarina S., Pennington S.R. Oral squamous cell carcinoma: key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Archives of Oral Biology*. 2016; **63**: 53-65.
- 86) Kim J., In Yook J., Ha Lee E. ve ark. Evaluation of premalignant potential in oral lichen planus using interphase cytogenetics. *J Oral Pathol Med*. 2001; **30**: 65-72.
- 87) Salahshourifar I., Vincent-Chong V.K., Kallarakkal T.G. ve ark. Genomic DNA copy number alterations from precursor oral lesions to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2014; **50**: 404-412.

- 88) Martin-Ezquerro G., Salgado R., Toll A. ve ark. Multiple genetic copy number alterations in oral squamous cell carcinoma: study of MYC, TP53, CCND1, EGFR and ERBB2 status in primary and metastatic tumours. *British Journal of Dermatology*. 2010; **163**: 1028-1035.
- 89) Kasamatsu A., Uzawa K., Usukura K. ve ark. Loss of heterozygosity in oral cancer. *Oral Science International*. 2011; **8**: 37-43.
- 90) Scully C., Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology*. 2009; **45**: 301-308.
- 91) Petersen P.E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century- the approach of the WHO Global Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; **1**: 3-23.
- 92) Özbek U., Hatırnaz Ö. İçinde Uğur Özbek, editor. *Tıbbi Genetiğin Esasları*. 6th ed. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2014. p.p. 180-195.
- 93) Aliustaoğlu M. Temel kanser fizyopatolojisi. *Klinik Gelişim*. 2009; **22**: 46-49
Erişim 04.05.2016, http://www.klinikgelisim.org.tr/eskisayi/kg22_3/8.pdf.
- 94) Gündüz E., Demirsoy A., Türkan İ. Çeviri editor. *Campbell N.A., Reece J.B. Biyoloji*. 6th ed.'den çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık; 2010. p.p.215-228.
- 95) Lents N.H., Baldassere J.J. Cell Division/ Death: Cell Cycle: Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases. *Encyclopedia of Cell Biology*. 2016; **3**: 423-431.
- 96) Çefle K. p53 Tümör Süpresör Geni. *İst. Tıp Fak. Dergisi*. 2003; **66**:121-126.
- 97) Çoğulu Ö., Alpman A., Durmaz B. ve ark. Mitoz ve Mayozun Moleküler Temelleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2007; **27**: 725-737.
- 98) Deviren A. *Genel Genetik*. İstanbul: İ.Ü. Basım ve Yayınevi; 2002. p.p. 11-34.
- 99) Schmitz M.L., Kracht M. Cyclin-dependent kinases as coregulators of inflammatory gene expression. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2016; **37** (2): 101-113.
- 100) Aktuğ H. Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Journal of Medicine*. 2014; **53**: 60-64. Erişim: 06.06.2016, <http://egetipdergisi.com.tr/text.php3?id=643>.
- 101) Zhao R., Choi B.Y., Lee M.H. ve ark. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16^{INK4A}) in Cancer. *EBioMedicine*. 2016; **8**: 30-39.
- 102) Ruas M., Peters G. The p16^{INK4a} / CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; **1378**: 115-177.

- 103) Eshkooor S.A., Ismail P., Rahman S.A. ve ark. P16 gene expression in basal cell carcinoma. *Archives of Medical Research*. 2008; **39**: 668-673.
- 104) Ensembl. Chromosome 9 (İnternette) 2016 Erişim: 27.07.2016, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?r=9:21967753-21995301;g=ENSG00000147889;db=core.
- 105) Akdeniz D., Tuncer Ş.B., Yazıcı H. Retinoblastoma (RB) gen yolağı ve kanser. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2014; **29** (4): 173-180.
- 106) Guo Y., Mahajan A., Yuan C. ve ark. Comparisons of the Conformational Stability of Cylin-Dependent Kinase (CDK) 4-Interacting Ankyrin Repeat (AR) Proteins. *Biochemistry*. 2009; **48**: 4050-4062.
- 107) Vairaktaris E., Yapijakis C., Psyrri A. ve ark. Loss of Tumour Supressor p16 Expression in Intial Stage of Oral Oncogenesis. *Anticancer Research*. 2007; **27**: 979-984.
- 108) Pérez-Sayáns M., Suárez-Peñaranda J.M., Gayoso-Diz P. ve ark. P16^{INK4a}/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough?. *Cancer Letters*. 2011; **306**: 134-141.
- 109) Zhao Y., Zhang S., Fu B. ve ark. Abnormalities of tumor suppressor genes p16 and p15 in primary maxillofacial squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999; **112**: 26-33.
- 110) Ohta S., Unemura H., Matsui Y. ve ark. Alterations of p16 and p14ARF genes their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2009; **107**: 81-91.
- 111) Nakahara Y., Shintani S., Mihara M. ve ark. Alterations of Rb, p16^{INK4A} and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*. 2000; **160**: 3-8.
- 112) Okami K., Reed A.L., Cairns P. ve ark. Cyclin D₁ amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Onkogene*. 1999; **18**: 3541-3545.
- 113) Weber A., Wittekind C., Tannapfel A. Genetic and epigenetic alterations of 9p21 gene products in benign and malignant tumors of the head and neck. *Pathol. Res. Pract*. 2003; **199**: 391-397.

- 114) Pande P., Mathur M., Shukla N.K. ve ark. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncology*. 1998; **34**: 396-403.
- 115) Romagosa C., Simonetti S., López-Vicente L.ve ark. P16^{Ink4a} overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 2011; **30**: 2087-2097.
- 116) Papadimitrakopoulou V., Izzo J., Lippman S.M. ve ark. Frequent inactivation of p16^{INK4a} in oral premalignant lesions. *Oncogene*. 1997; **14**: 1799-1803.
- 117) Poomsawat S., Buajeeb W., Khovidhunkit S.P. ve ark. Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy. *J Oral Pathol Med*. 2011; **40**: 294-299.
- 118) Montebugnoli L., Venturi M., Gissi D.B. ve ark. Immunohistochemical expression of p16^{INK4A} protein in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2011; **112**: 222-227.
- 119) Goel S., Khurana N., Marwah A. ve ark. Expression of cdk4 and p16 in oral lichen planus. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*. 2016; **6** (2): 1-7.
- 120) Uzawa N., Sonoda I., Myo K. ve ark. Fluorescence in Situ Hybridization for Detecting Genomic Alterations of Cyclin D1 and p16 in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Cancer*. 2007; **110**: 2230-2239.
- 121) Tsuchiya K.D. Fluorescence in situ hybridization. *Clin Lab Med*. 2011; **31**: 525-542.
- 122) Wan T.S.K., Ma E.S.K. Molecular cytogenetics: an indispensable tool for cancer diagnosis. *Chang Gung Med J* 2012; **35**: 96-110.
- 123) Tönnies H. İçinde Patrinos G.P., Ansorge W.J. editor. *Molecular Diagnosis* 2nd ed. The United States of America: Elsevier; 2010. p.p. 133-153.
- 124) Vorsanova S., Yurov Y.B., Iourov I.Y. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies. *Molecular Cytogenetics*. 2010; **3**: 1-15
- 125) Riegel M. Human molecular cytogenetics: from cells to nucleotides. *Genetics and Molecular Biology*. 2014; **37** (1): 194-209.
- 126) Kearney L. Molecular cytogenetics. *Best Practice and Research Clinical Haematology*. 2001; **14** (3): 645-668.

- 127) Munson P. İçinde Patel H.R.H., Arya M., Shergill I.S. editor. Immunohistochemistry. *Basic Science Teqniques in Clinical Practise*. London: Springer London; 2007. p.p. 18-30. Erişim 24.06.2016, http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-84628-740-4_3.
- 128) Drew. C.P., Shieh W.J. Immunohistochemitry. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*. 2015; **2**: 109-115.
- 129) Hunt J., Davydova L., Cartun R.W. ve ark. İçinde Coleman W.B., Tsongalis G.J. editor Immunohistochemistry. *Molecular Diagnostics*, (2nd ed). New York: Humana Press.; 2005; 203-217 Erişim 24.06.2016, <http://link.springer.com/chapter/10.1385/1-59259-928-1:203>.
- 130) Buchwalow I.B., Böcker W. Immunohistochemistry: Basics and Methods. Verlag Berlin, Heidelberg: Springer.; 2010. p.p. 31-39. Erişim 25.06.2016, <http://www.springer.com/us/book/9783642046087>.
- 131) Cytocell an OGT company aquarius, p16 Deletion Probe (İnternette) Erişim: 08.09.2016 http://www.cytocell-us.com/assets/000/001/209/LPH009ASR_v008.00_original.pdf?1437574181.
- 132) Korshunov A., Sycheva R., Gorelyshev S. ve ark. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Modern Pathology*. 2005; **18**: 1258-1263.
- 133) Dr. Jeremy Squire Laboratory. Establishing “Cut-Off” Values for Classifying a Tumour as PTEN Deleted. (İnternette) Erişim: 12.09.2016 <http://ptendeletion.net/wordpress/wp-content/uploads/2012/01/Establishing-cut-offs1.pdf>.

FORMLAR

İ.Ü. ONKOLOJİ ENSTİTÜSÜ
TÜMÖR PATOLOJİSİ VE ONKOLOJİK SİTOLOJİ BİLİM DALI LABORATUVARI
HASTA BİLGİLENDİRME ONAM FORMU

Hastanın Adı- Soyadı:
Doğum Tarihi:
Cinsiyeti:
T.C. Kimlik No:
Telefon No:

Tarih: / /20
Saat: :
Hasta Protokol No: /20

Laboratuvarımıza teslim ettiğiniz doku/sıvı örneği ya da cerrahi materyalden elde edilen
lam ve blokların bilimsel çalışmalarda kullanılmasını;

A) EVET Onaylıyorum ()

B) HAYIR Onaylamıyorum ()

Adı Soyadı
İmza

Yakınlığı:.....

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI



Sayı : 83045809/604.01/02 - 40867
Konu:

İstanbul / /
09 Şubat 2015

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İlgi: 14.01.2015 tarih, 76624604/050.99-53 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Ayhan DEVİREN**'in danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Melis ERDOĞAN**'ın yürütücülüğünde **Yard.Doç.Dr.Merva Soluk TEKKEŞİN**'in yardımcılığında "**Oral Liken Planus Olgularında p16 gen aktivasyonunun floresans in situ hibridizasyon (FISH) ve immunohistokimyasal (IHC) yöntemlerle değerlendirilmesi**" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi (Retrospektif)** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **03 Şubat 2015** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini rica ederim


Prof.Dr.Özgür KASAPÇOPUR
Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı

Eki:
1 dosya