

İŞL MELİS ZÜMRÜT

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MITOKONDRIYAL ELEKTRON TRANSPORTUNDA
GÖREV ALAN *NDUFB3* GENİNİN ORAL PREMALIN
LEZYONLARDA EPIGENETİK BİYOBELİRTEÇ
POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

İŞİL MELİS ZÜMRÜT

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMRA DEMOKAN**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ**

İSTANBUL-2022

ITHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Sayın **Prof.Dr. Osman Bülent ZÜLFİKAR'a**,

Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof.Dr. Hatice Bilge BECERİR'e**

Yüksek lisans eğitimim boyunca her anımda desteğini esirgemeyen, bilim insanı olma yolunda tüm bilgi ve birikimini eksiksiz bir şekilde aktaran; tez çalışmam süresince değerli düşünceleri ve önerileriyle beni yönlendiren, sadece eğitim alanında değil hayatın birçok kısmında bana akıl hocalığı yapan biricik tez danışmanım Sayın **Prof.Dr. Semra DEMOKAN'a**,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Sayın **Doç.Dr. Murat ULUSAN'a**,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Sayın **Prof.Dr. Gösüm AK'a**,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Sena ŞEN, Kübra Gizem ESENTÜRK YAYLA, Metehan KARATAŞ, Begüm BULUŞLU, Fulya KARAYEĞİT, Madona GJONA ve Hüseyin Enes DERYA'ya,

Tüm eğitim sürecim boyunca tavsiye ve özverilerini esirgemeyen sevgili annem **Güldan ZÜMRÜT**, babam **Bülent ZÜMRÜT**, kız kardeşim **Yeliz ZÜMRÜT'e** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamız, Türkiye Bilimsel ve Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından TÜBİTAK-SBAG-114S497 numara ile desteklenen projeden elde edilen bulgulardan üretildi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37756

İÇİNDEKİLER

İTHAF	2
TEŞEKKÜR	3
İÇİNDEKİLER	4
TABLolar LİSTESİ	7
ŞEKİLLER LİSTESİ	8
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	15
ABSTRACT	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ	17
2. GENEL BİLGİLER	19
2.1. Oral Kavitenin Anatomik Yapısı	19
2.2. Oral Kavitenin Premalin Lezyonları (OPML)	20
2.2.1. OPML Epidemiyolojisi	22
2.2.2. OPML Etiyoloji ve Risk Faktörleri	23
2.2.3. OPML Tanı, Tedavi ve Önlem	24
2.3. Oral Kavitenin Kanserle İlişkisi	26
2.3.1. Dil Tümörleri	27
2.3.2. Dudak Tümörleri	27
2.3.3. Bukkal Mukoza Tümörleri	28
2.3.4. Retromolar Trigon Tümörleri	29
2.3.5. Ağız Tabanı Tümörleri	29
2.3.6. Alt ve Üst Damak Bölgesi Tümörleri	29
2.3.7. Alveolar Ridge Bölgesi Tümörleri	30
2.4. Oral Skuamoz Hücreli Karsinom (OSCC)	30
2.4.1. OSCC Histopatolojisi	30
2.4.2. OSCC Epidemiyolojisi	31
2.4.3. OSCC Risk Faktörleri ve Etiyoloji	31
2.4.3.1. Tütün ve Türevlerinin Kullanımı	31
2.4.3.2. Alkollü İçecek Tüketimi	32
2.4.3.3. Betel Quid ve Areca Nut Çiğnenmesi	32

2.4.3.4. Human Papilloma Virüs (HPV).....	32
2.4.3.5. Ağız Hijyeni	33
2.4.3.6. Besin Tüketimi.....	33
2.4.4. OSCC Evrelemesi ve Hastalığın Seyri	34
2.4.5. OSCC Tanı ve Tedavi Yaklaşımları	35
2.5. Oral Kavite Tümörlerinin Moleküler Biyolojisi	37
2.5.1. Oral Karsinogenez	37
2.5.2. Genetik Değişiklikler.....	39
2.5.3. Epigenetik Modifikasyonlar	41
2.5.3.1. DNA Metilasyonu.....	41
2.5.3.1.1. Hipermetilasyon	43
2.5.3.1.2. Hipometilasyon	45
2.5.4. Oral Tümörlerde Biyobelirteçler	47
2.6. NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B3 (<i>NDUFB3</i>).....	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. MATERYAL	51
3.1.1. Tez Çalışması İçin Gerekli Olan Ekipmanlar	51
3.1.2. Tez Çalışması İçin Gerekli Olan Kimyasal Maddeler	52
3.1.3. Tez Çalışması İçin Kullanılan Kimyasal Solüsyon ve İçerikleri	52
3.2. YÖNTEM	52
3.2.1. Gerekli Materyellerin Toplanması.....	52
3.2.1.1. Dokuların Toplanması.....	52
3.2.1.2. Serum Örneklerinin Elde Edilmesi	53
3.2.1.3. Tükürük Örneklerinin Elde Edilmesi.....	53
3.2.2. Nükleik Asitlerin İzolasyonu	53
3.2.2.1. Dokudan DNA'ların Eldesi	53
3.2.2.2. Serumdan DNA'ların İzolasyonu	54
3.2.3. RNA İzolasyonu	55
3.2.3.1. Dokudan Total RNA Eldesi.....	55
3.2.4. cDNA Dönüşümü	56
3.2.5. Bisülfid Dönüşümü.....	56
3.2.6. Ekspresyon ve Metilasyon Deneyleri İçin Primer ve Prob Tasarlanması.....	57

3.2.7. QMSP (Metilasyona Spesifik Olan Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Metilasyon Analizi	59
3.2.8. QRT-PCR (SYBR Green Temelli Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR) Tekniği ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	60
3.2.9. Dataların İstatistiksel Olarak Analiz Edilmesi	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. Hasta Bireylerin Klinik ve Sağlıklı Bireylerin Demografik Bulguları.....	62
4.2. <i>NDUFB3</i> Genine Ait Verilerin Ekspresyon Analizleri	65
4.3. <i>NDUFB3</i> Genine Ait Verilerin Metilasyon Analizleri.....	88
4.3.1. Metilasyona Bağlı <i>NDUFB3</i> Genindeki Ekspresyon Seviyesinde Azalma.....	90
5. TARTIŞMA.....	92
KAYNAKLAR.....	96
HAM VERİLER	119
FORMLAR.....	120
İNİTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	122

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Oral Kavite Tümörleri TNM Evrelemesi.....	34
Tablo 2. Tez Deneyleri İçin Kullanılan Cihazlar.....	51
Tablo 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	52
Tablo 4. Kimyasal Karışımlar.....	52
Tablo 5. cDNA Dönüşümünde Kullanılan Solüsyonlar ve PCR Koşulları.....	56
Tablo 6. <i>NDUFB3</i> geninin Ekspresyon ve Metilasyon Deneylerinde Kullanılan primer ve prob dizileri.....	58
Tablo 7. <i>ACTB</i> geninin Ekspresyon ve Metilasyon Deneylerinde Kullanılan primer ve prob dizileri.....	59
Tablo 8. QMSP Deneylerinde Uygulanan Reaksiyon Karışımı ve Koşulları.....	59
Tablo 9. QRT-PCR Deneylerinde Uygulanan Reaksiyon Karışımları ve Koşulları.....	60
Tablo 10. Çalışmaya Katılan Hasta/Sağlıklı Grupların Klinik/Demografik Özellikleri.....	63
Tablo 11. OPML Grubunun Klinik ve Patolojik Verileri.....	63
Tablo 12. OSCC Grubunun Klinik ve Patolojik Verileri.....	64
Tablo 13. OSCC hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları.....	66
Tablo 14. OPML hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları.....	67
Tablo 15. OSCC/OPML hasta gruplarının tümör, eşlenik normal dokuları ile tükürük ve serum örnekleriyle sağlıklı bireylerin tükürük, mukoza ve serumlarının kat-değişim (fold-change) değerleri.....	73
Tablo 16. OSCC ve OPML gruplarındaki Tümör-Eşlenik Normal ve Tümör-Sağlıklı Dokularda <i>NDUFB3</i> Genindeki Özgüllük, Duyarlılık ve Eşik (cut-off) Değerleri.....	88
Tablo 17. OSCC ve OPML gruplarındaki Serum-Tükürük Örneklerindeki <i>NDUFB3</i> Geninde Özgüllük, Duyarlılık ve Eşik (cut-off) Değerleri.....	88

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Oral Kavitenin Anatomik Yapısı.....	20
Şekil 2. Lökoplaki Klinik Görünümü.....	21
Şekil 3. Oral Liken Planus Klinik Görünümü.....	22
Şekil 4. Oral Kanserlerin Dünya Nüfusu Üzerindeki Dağılımı.....	27
Şekil 5. OSCC'nin Histopatolojisi. A) Dilde yarı organize keratinizasyona sahip olgun hücreleri içeren iyi farklılaşmış skuamöz hücreli karsinom. B) Dil tabanının kötü farklılaşmış skuamöz hücreli karsinomu.....	30
Şekil 6. Kanser Hallmak'ları.....	38
Şekil 7. DNA Metilasyonu.....	42
Şekil 8. Dokudan DNA İzolasyon Basamakları.....	54
Şekil 9. Serumdan DNA İzolasyonu Basamakları.....	55
Şekil 10. Dokudan Total RNA İzolasyonu.....	55
Şekil 11. Bisülfid Dönüşüm Basamakları.....	57
Şekil 12. <i>NDUFB3</i> geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarının şematik görünümü.....	68
Şekil 13: Tümör ve normal doku cDNA örneklerinde <i>ACTB</i> ve <i>NDUFB3</i> Amplifikasyon Eğrileri.....	65
Şekil 14. OSCC hastalarına ait eşlenik normal doku, tümör dokusu ve vücut sıvı örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri.....	68
Şekil 15. OPML hastalarının vücut sıvıları, kombine normal doku ve tümör doku örneklerindeki ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri.....	69
Şekil 16. Sağlıklı gruba ait mukoza, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri.....	70
Şekil 17. OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokularının kombine normal dokulara kıyasla $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri.....	71
Şekil 18. OSCC ve OPML bireylerine ait tümör dokularında normal dokularına göre relatif olarak hesaplanan ekspresyon düzeylerinin artma ve azalma oranları	72
Şekil 19. OSCC hastalarında anatomik tutulumuna göre <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	74

Şekil 20. Premalin hasta grubunun patolojik gruplarına göre <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler.....	76
Şekil 21. OSCC grubunda evrelere göre <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler.....	77
Şekil 22. OSCC grubunda <i>NDUFB3</i> geninin erken ve geç evreye göre ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler.....	78
Şekil 23. OSCC ve OPML gruplarında cinsiyete bağlı ekspresyon seviyelerinde görülen değişiklikler.....	79
Şekil 24. OSCC ve OPML gruplarında sigara içen / içmeyen hastalar arasındaki ekspresyon artış ve azalış seviyelerindeki değişiklikler.....	80
Şekil 25. OSCC ve OPML gruplarında alkol kullanan / kullanmayan hastalar arasındaki ekspresyon artış ve azalış seviyelerindeki değişiklikler.....	82
Şekil 26. OSCC grubunda differansiyasyon seviyelerine göre <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler.....	83
Şekil 27. Lenf nodu tutulum durumuna göre hastalar arasında <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler.....	84
Şekil 28. OSCC grubuna ait doku örneklerinin ROC analizi. (A) OSCC grubunda tumor/sağlıklı dokularında <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) OSCC grubunda tumor/eşlenik normal dokularında <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC Analizi.....	84
Şekil 29. OSCC vücut sıvı örneklerinin ROC analizi. (A) OSCC grubunda serum/sağlıklı serum <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) OSCC grubunda serum/sağlıklı serum <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.....	86
Şekil 30. OPML grubunun doku örneklerinin ROC analizi (A) Premalin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) OPML grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.....	87
Şekil 31. OPML grubunun vücut sıvı örneklerinin ROC analizi (A) Premalin grubunda serum ile sağlıklı serum <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) OPML grubunda serum ile sağlıklı serum <i>NDUFB3</i> geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.....	87
Şekil 32. <i>ACTB</i> Amplifikasyon Eğrileri.....	91

Şekil 33. <i>NDUFB3</i> Amplifikasyon Eğrileri.....	91
Şekil 34. Standart Curve Eğrisi.....	92
Şekil 35. OSCC ve OPML Hasta Bireylerinin Tümör ve Normal Dokularında ve Sağlıklı Dokuda <i>NDUFB3</i> Geninin Promoter Bölgesindeki CpG Adacıklarındaki Metilasyon Seviyeleri.....	92
Şekil 36. OSCC Hasta Grubunda <i>NDUFB3</i> Geninin Ekspresyon ve Metilasyon Seviyelerinin One-way Anova Analizi İle Gösterimi.....	93



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-FU	: 5-florourasil
AE	: Elution Buffer (Elüsyon tamponu)
ACTB	: Beta Aktin
AdSCC	: Adenoid Skuamöz Hücreli Karsinom
AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AK	: Aktinik keratoz
ALA	: Aminolaevulinik asit
ALDH2	: Aldehit Dehidrojenaz 2
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli Geni
ASC	: Adenoskuamöz Karsinom
AW1	: Wash Buffer I (Yıkama tamponu 1)
AW2	: Wash Buffer II (Yıkama tamponu 2)
BSCC	: Bazaloid skuamöz hücreli karsinoma
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CAT	: Bilgisayarlı Aksiyal Tomografi
cDNA	:Komplementer DNA
CGI	: CpG adacıkları
CHD	: Kromodomain helikaz DNA bağlama Proteini
CT	: Kontrastsız Tomografi
DNA	: Deoksiribonükleik asid
DNMT	: DNA metiltransferaz
EF	: Ekspresyon Forwad
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitel-Mezenkimal Transition (Epitel-Mezenkimal Dönüşüm)
ER	: Ekspresyon Revers
FAM	: 6-florosein amid
HAT	: Histon asetil transferaz
HDAC	: Histon deasetilaz

HDM	: Histon demetilazlar
HMT	: Histon metiltransferaz
HNC	: Baş-Boyun Kanserleri
HNSCC	: Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlar
HPV	: Human Papilloma Virüsü
HR	: Histolojik risk
HSV	: Herpes Simplex Virus
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
ICT	: İndüksiyon kemoterapisinin
IMRT	: Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi
ISWI	: Yapay SWI
KC	: Keratinosit karsinomuna
lncRNA	: Uzun kodlamayan RNA
LNT	: Lenf Nodu Tutulumu
LOH	: Heterozigotluk Kaybı
LP	: Liken planus
MAL-PDT	: Metil aminolaevulinat PDT
MF	: Metilasyon Forward
miRNA	: microRNA
MR	: Metilasyon Revers
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NBI	: Dar bant görüntüleme
NDUFB3	: NADH:Ubikinon NADH Dehidrojenaz
NuRD	: Nükleozom yeniden modellenmesi ve deasetilasyon
OCC	: Oral Cell Carcinoma
OED	: Oral epitelyal displazi
OL	: Oral lökoplaki
OLP	: Oral liken planus
OPML	: Oral premalin lezyonlar
OS	: Genel sağkalım

OSCC	: Oral skuamöz hücreli karsinom
OSMF	: Oral submukoz fibrozis
OTSCC	: Oral Dil Skuamöz Hücreli Karsinomu
OVC	: Oral verrüköz carsinom
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET	: Pozitron emisyon tomografisi
PNI	: Perinöral invazyon
PMD	: Potansiyel malin bozukluk
PSCC	: Papiller skuamöz hücreli karsinoma
PPOEL	: Premalin oral epitelyal lezyonlar
PVL	: Proliferatif verrüköz lökoplaki
QMSP	: Kantitatif metilasyon spesifik PCR
QRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polmeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
RMT	: Retromolar trigon
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT	: Radyoterapi
SAH	: S-adenosilhomosisteine
SAM	: S-adenosilmetiyonin
SCC	: Skuamöz hücreli karsinom
SCSC	: İğsi hücre/sarkomatoid karsinom
SNF	: Sükroz fermentasyon
snoRNA	: Kısa nükleolar RNA
SWI	: Pozisyon hasarı
TAMRA	: Karboksitetrametlrodamin
TC	: Tag cluster
TNM	: Primer tümör/bölgesel lenf nodu metastazı/uzak metastaz
TSG	: Tümör baskılayıcı genler
TSNA	: Tütüne özgü nitrozaminler
TRS	: Transoral Robotik Cerrahi

UPPP	: Uvulopalatopharyngoplasty (Uvulopalatofaringoplasti)
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WPOI	: En kötü invazyon modeli



ÖZET

ZÜMRÜT, I.M. (2022). Mitokondriyal Elektron Transportunda Görev Alan *NDUFB3* Geninin Oral Premalin Lezyonlarda Epigenetik Biyobelirteç Potansiyelinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Baş-boyun kanserleri arasında yer alan oral kavite kanserlerinin %90 gibi büyük bir kısmı oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC)'dan oluşmaktadır. Oral kanserler etiyolojik olarak sıkça çevresel özelliklerden etkilenmesi sebebiyle hem genetik hem de epigenetik çalışmaların birlikte incelendiği bir kanser türüdür. Oral kanserlerde gözlenen en yaygın epigenetik modifikasyon DNA'daki 5'-CG-3' dizisindeki sitozinin 5 pozisyonundaki karbona bir metil grubunun (CH₃) kovalent olarak eklenmesi olan DNA metilasyonudur. Demokan ve ark. yapmış olduğu TÜBİTAK-SBAG-114S497 no'lu çalışmada OSCC hastalarında tümör dokusunun eşlenik normal dokuya göre *NADH:Ubikinon NADH Dehidrojenaz (NDUFB3)* genine ait promoter bölgesinde yer alan CpG adacıklarında hipometillendiği ve ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. Çalışmamızda, 30 OSCC ve 30 OPML hastasına ait eşlenik normal doku, tümör, vücut sıvıları ve 15 sağlıklı normal mukoza ve vücut sıvısı örneklerinde *NDUFB3* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyelerini inceledik. OSCC ve OPML hasta grupları ile sağlıklı gruplardan elde edilen veriler arasındaki moleküler farklılıklar ve klinik bilgiler karşılaştırılarak *NDUFB3* geninin kanserin erken tanısında biyobelirteç olarak potansiyel kullanılabilirliği incelendi. *NDUFB3* geninin ekspresyon düzeyini belirlemek için qRT-PCR yöntemi, metilasyon düzeyini belirlemek için qMSP yöntemi kullanıldı. Yapılan deneyler sonucunda; OPML hasta grubunun yaklaşık %23'ünde genin ekspresyon seviyesinde azalma, yaklaşık %36'sında genin ekspresyon seviyesinde artış gözlenirken %40'ında genin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. OSCC grubunun yaklaşık %33'ünde eşlenik normal dokuya kıyasla genin ekspresyon seviyesinde artma, %40'ında genin ekspresyon seviyesinde azalma tespit edildi. OSCC ve OPML gruplarının ve sağlıklı grubun tümör, normal doku ve vücut sıvı örneklerinde metilasyona rastlanmamıştır. OSCC ve OPML hasta gruplarının ekspresyon seviyesindeki değişiklikler klinik parametreler ile kıyaslandığında anlamlılık görülmesine rağmen metilasyon varlığı tespit edilememesinden dolayı değişen ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. OPML grubunda *NDUFB3* geninin hipometilasyonu ve *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyesinde artma görülmesi spesifik olarak maliniteye yatkın olduğu görüşünü destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Epigenetik, Metilasyon, Ekspresyon, OSCC, OPML

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37756

ABSTRACT

Zumrut, I.M. (2022). Investigation of The Epigenetic Biomarker Potential of The *NDUFB3* Gene in Oral Premalignant Lesions Involved in Mitochondrial Electron Transport. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Master Thesis. İstanbul.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) constitutes 90% of oral cavity cancers, which are among the head and neck cancers. Oral cancer is a type of cancer in which both genetic and epigenetic studies are examined together since it is frequently affected by environmental features. The most common epigenetic modification observed in oral cancers is DNA methylation, which is the covalent addition of a methyl group (CH₃) to the carbon at position 5 of cytosine in the 5'-CG-3' sequence of DNA. In the study numbered TÜBİTAK-SBAG-114S497 by Demokan et al., it was observed that tumor tissue in OSCC patients was hypomethylated in the CpG islets in the promoter region of the NADH:Ubiquinone NADH Dehydrogenase (*NDUFB3*) gene compared to the conjugated normal tissue, and accordingly, there was an increase in its expression levels. In our study, we examined the expression and methylation levels of the *NDUFB3* gene in tumor, conjugated normal tissue, serum and saliva samples from 30 OSCC and 30 OPML patients and in normal mucosa, serum and saliva samples from 15 healthy individuals. The potential utility of the *NDUFB3* gene as a biomarker in the early diagnosis of cancer was examined by comparing the clinical information and molecular differences between data from OSCC and OPML patient groups and healthy groups. The qRT-PCR method was used to determine the expression level of the *NDUFB3* gene, and the qMSP method was used to determine the methylation level. As a result of the experiments; While a decrease in expression level was observed in approximately 23% of the OPML patient group, an increase in expression level was observed in approximately 36%, no significant change in expression level was observed in 40%. Compared to the conjugated normal tissue, approximately 33% of OSCC patients had an increase in expression level and a decrease in 40%. No methylation was found in tumor, normal serum and saliva samples of OSCC and OPML patients and healthy group. Although the changes in the expression level of OSCC and OPML patient groups were significant when compared with clinical parameters, it was determined that there was no significant effect on the changing expression levels because the presence of methylation could not be detected. Changes in the expression level of the *NDUFB3* gene in OSCC and OPML patient groups are thought to be due to mutations in the carcinogenesis mechanism.

Key Words: Epigenetics, Methylation, Expression, OSCC, OPML

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2021-37756

1. GİRİŞ VE AMAÇ

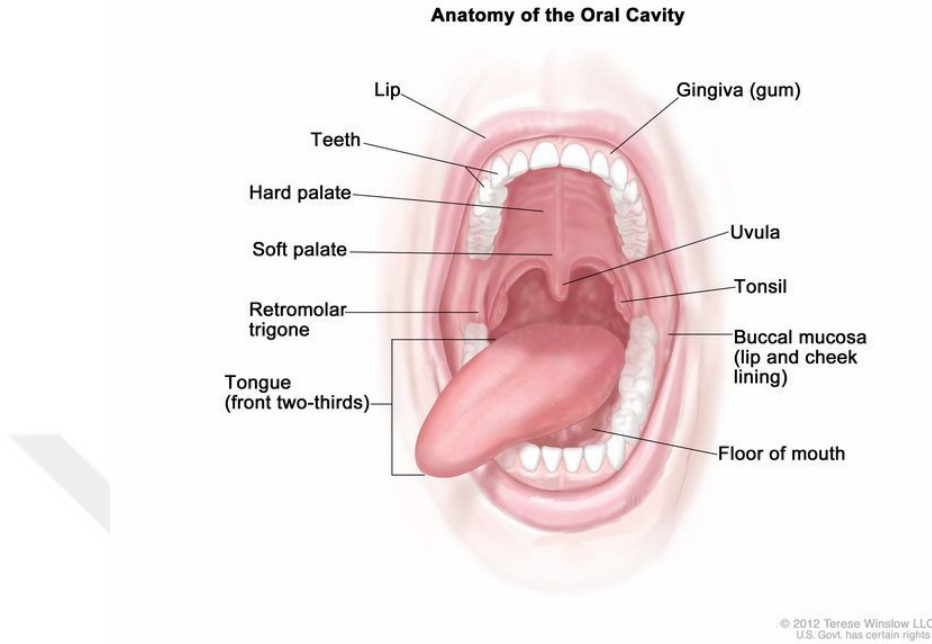
Kanser, 2020 yılı itibariyle yaklaşık 10 milyon ölümden sorumlu olan dünya çapında en önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Bu sayıların 2040 yılına kadar 29,5 milyon vaka ve 16,4 milyon ölüm oranlarına kadar yükselmesi öngörülmektedir. Kanserden meydana gelen ölümlerin yaklaşık üçte biri alkol ve tütün tüketimi, sağlıksız beslenme ve aktivite eksikliğinden kaynaklanmaktadır. En sık görülen kanserler meme, akciğer, kolon ve rektum ve prostat kanserleri olup baş ve boyun kanserleri de dünya çapında çok gözlenen kanser türlerinden biridir. Baş ve boyun kanserleri, üst solunum-sindirim sistemi kanserlerini (oral kavite, nazofarenks, orofarenks, hipofarenks ve gırtlak dahil), paranasal sinüsleri ve tükürük bezlerini içerir. Araştırmacılar, 2021 yılı itibariyle dünya üzerinde yaklaşık 900.000 baş-boyun kanseri vakası görüldüğünü tespit etmiştir (WHO, 2022). Skuamöz hücreli karsinom açık ara en yaygın görülen tipi olmasına rağmen, farklı bölgelerdeki kanserler farklı seyirlere ve değişken histopatolojik tiplere sahiptir. Etkilenen anatomik bölgeler konuşma, yutma, tat alma ve koku alma gibi işlevlerde önemli olduğu için baş boyu kanserinin varlığı ve tedavisi önemli fonksiyonel sekellere sahip olup yaşam kalitesini bozabilir (Mehanna, Paleri, West ve Nutting, 2010). Baş boyun kanserleri içerisinde en sık rastlanan kanser çeşiti oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC)' dir. 2020 yılı itibariyle dünya genelinde yeni OSCC vaka sayısı 377.713, aynı yıldaki ölüm sayısı ise 177.757 olmuştur (Vyhnalova, Danek, Gachova ve Linhartova, 2021). Oral premalin lezyonlar (OPML) normal dokuya göre kanser geliştirme ihtimali daha fazla olan morfolojik veya genetik özellikleri bakımında değişikliğe uğramış doku bölgesidir. OPML'nin klinik muayene ve biyopsi materyalinin histopatolojik değerlendirilmesi oral kanserlerin gelişimini kontrol etmede ve önlemede oldukça önemlidir (Guillaud, Zhang, Poh, Rosin ve MacAulay, 2008). Hem displazi gelişim aşamalarını hem de maliniteye dönüşüm potansiyelini ilk aşamalardan itibaren belirleyebilecek biyobelirteçleri ayrıca tedaviye yönelik ilaç hedeflerini belirlemek için neoplastik progresyonun mekanizmasını anlamak önem kazanmaktadır (Degen, Barron, Natarajan, Widlund ve Rheinwald, 2013). Oral kavitenin premalin/malin lezyonlar, genomik değişimler ve çevresel karsinojenlere maruziyetin ortak sonucu olarak meydana gelen moleküler ve biyokimyasal değişikliklere bağlı olarak gelişmektedir (Califano ve diğerleri, 1996). Son yıllarda epigenetik değişikliklerden biri olan DNA metilasyonundaki artma ve azalmaların, tümörlerin inisiyasyon ve progresyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Metillenmiş genlerin

veya metillenmiş gen kümelerinin tanımlanması, kanser tespiti veya prognozu için yeni biyobelirteçler keşfine olanak verir (Kanwal, Gupta ve Gupta, 2015). Oral kavite, hem bu epigenetik faktörlere en fazla maruz kalan, hem de gözlemlenebilmesi en kolay bölge olduğu için premalin ve malin lezyonların oluşum ve gelişimi ile ilişkili epigenetik mekanizmaları incelemek açısından en iyi modeldir. Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinomlarda (HNSCC) DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, anjiyogenez, hücre-hücre etkileşimi ve metastaz gibi yollardaki genlerde DNA metilasyonu gözlenmektedir (Fan, 2004). Kanserde, hipometilasyon sıklıkla bir onkogen görevi gören ve kanserde hipometillenmiş gen olduğu bildirilen transkripsiyon faktörü c-Myc gibi onkogenlerin fonksiyon kazancı ile ilişkilidir. Ayrıca, spesifik promotörlerde hipometilasyon, onkogenlerin anormal ekspresyonunu aktive edebilir ve imprinting'e neden olabilir (Cheung, Lee, Rennert ve Chan, 2009). Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının yaptığı TÜBİTAK-SBAG-114S497 no'lu çalışmasında elde edilen array verilerine göre ileri validasyonu gerçekleştirilecek NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B3 (*NDUF3*) geninin OPML'nin Oral Liken Planus alt tipine ait tümör dokuları ile eşlenik-normal dokularındaki metilasyon ve ekspresyon array datalarına göre hipometillenmiş olduğu ve ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. *NDUFB3* geninin premalin lezyonların oluşumunda ve premalin lezyonların malin transformasyonunda önemli bir rolü olan potansiyel biyolojik belirteç olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle tez projemizde, OPML tanılı hastaların doku ve vücut sıvı örneklerinde *NDUFB3* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyeleri incelendi, her bir OPML alt grubu için sonuçlar ayrı ayrı değerlendirildi. Aynı zamanda, OPML alt gruplarının maliniteye dönüşüm riskini belirlemek ve OPML'in OSCC'den ayırıcı tanısını tespit etmek amacıyla OSCC hastalarının doku ve vücut sıvılarında aynı anda metilasyon ve ekspresyon seviyeleri incelendi. Literatürde OPML ve OSCC hasta gruplarının doku ve vücut sıvısı örneklerinde *NDUFB3* geninin ayrı ayrı ya da bir arada inceleyen çalışma literatürde bulunmadı için oral karsinogenez mekanizmasına ışık tutacak değerli bilgiler katacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Kavitenin Anatomik Yapısı

Oral kavite; çiğneme, fonasyon, besin alımı, konuşma ve nefes almak için burun boşluğuna bir alternatif yol olarak işlev gören anteriorda alt ve üst dudakların birleştiği noktadan başlayarak sert damak, yumuşak damak bileşkesi, posteroinferiorda papillaların ön tarafı ve tonsiller plikalar arasında kalan sınırları belirlenmiş bir bölgedir (Chi, Day ve Neville, 2015; Som, Smoker, Curtin, Reidenberg ve Laitman, 2011). Anatomik olarak oral kavite ve orafarenks birbirlerine sınırları olan ama kesişmeyen ayrı bölgelerdir. Oral kavite yedi alt bölgeye ayrılır: dudaklar, bukkal mukoza (dudakların ve yanakların iç astarı), retromolar trigon olarak adlandırılan yirmi yaş dişlerinin arkasındaki alan, alveoler ridge, ağız tabanı, dilin üçte ikisi ve yumuşak damak/sert damak (Şekil 1). Gingivobuccal sulkus kompleksi, bukkal mukoza, retromolar trigon, alt gingiva ve üst gingivobuccal sulkustan oluşur (Bahadur ve Iyer, 2021). Orofarenks oral kavitenin hemen arkasında besin ve hava için ortak bir geçiş yolu olarak işlevde bulunmaktadır. Yutma ve hava yolu arasındaki koordinasyonu sağlamak en önemli görevidir. Ağız boşluğunun ve orafarenksin her yerinde bulunan tükürük bezleri, ağız ve boğaz kısmını nemli tutan ve besinleri sindirmeye yardımcı olan tükürük üretir. Ağız boşluğunun tamamı çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Epitel astarı, çiğneme epiteli ve astar epiteli olmak üzere iki geniş tipe ayrılır. Çiğneme epiteli, yiyeceklerin işlenmesinde yer alan dil, diş eti ve sert damak gibi yüzeyleri kapsar. Fonksiyon sırasındaki fiziksel kuvvetlerin büyüklüğü, ağız boşluğu içindeki herhangi bir yüzey için epitel keratinizasyon derecesini belirler. Astar epiteli, keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir ve ağız boşluğunun kalan yüzeylerini kaplar (Prisman, Miles ve Genden, 2019).



Şekil 1. Oral Kavitenin Anatomik Yapısı (National Cancer Institute, 2022)

2.2. Oral Kavitenin Premalin Lezyonlari (OPML)

Premalin (prekanseröz) olgular, oral kanserin ortaya çıkma olasılığının görünüşte normalden daha fazla olduğu morfolojik olarak değişikliğe uğrayan prekanseröz lezyonlar veya artmış kanser riski ile ilişkilendirilen prekanseröz durumlardır (S. Warnakulasuriya, Johnson ve Van Der Waal, 2007). Literatürde 'kanser öncesi', 'öncü lezyonlar', 'premalin', 'intraepitelyal neoplazi' ve 'potansiyel olarak kötü huylu' olarak tanımlanmaktadır (S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, oral mukozanın malin transformasyona uğrayabilen lezyonları ve durumları, potansiyel olarak malin bir bozukluk (Premalignant Deficiency, PMD) olarak tanımlanmaktadır (S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). Oral kavite, premalin olgularının %5'inden büyük bir çoğunluğunun bir kısmının kansere dönüştüğü bir bölgedir (Vigneswaran ve El-Naggar, 2016; S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). Bu yüzden premalin tanısı, olası malin oluşumların erken tespit edilmesi bakımından önem kazanmaktadır (Vigneswaran ve El-Naggar, 2016; S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007).

Kelime olarak plak/beyaz leke anlamına gelen lökoplaki; histopatolojik olarak sınıflandırılmayan, kanser için şüpheli risk taşıyan beyaz bir lezyon olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2) (Rethman ve diğerleri, 2010; Isaac van der Waal, 2009). Lökoplaki, klinik bir tanım olduğu ve aynı zamanda herhangi bir histolojiyle bağlantılı

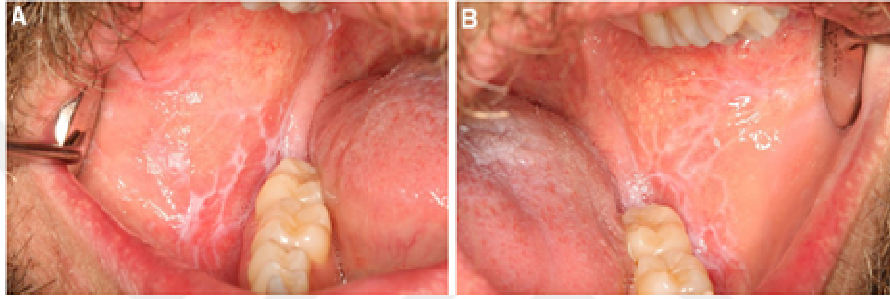
olmadığı için epitelyal displazinin spesifik bir aşamasının varlığına veya yokluğuna işaret etmez (Abati, Bramati, Bondi, Lissoni ve Trimarchi, 2020). Lökoplakilerin ağız mukozasında en sık görüldüğü yerler alveolar mukoza olup ardından bukkal mukoza, damak, dil ve ağız tabanı gelir (Bewley ve Farwell, 2017). Son yıllarda bildirilen çalışmalarda oral lökoplaki prevalansı %1,1 ile %11,7 arasında değişmektedir (Bánóczy, Gintner ve Dombi, 2001). Oral lökoplakiler klinik olarak iki gruba ayrılabilir: homojen ve homojen olmayan lezyonlar (Haim, 1981). Homojen lökoplakiler daha yaygın ve çoğunlukla iyi huyludur; küçük yüzeysel çatlaklarla birlikte tek biçimli ve düz görünüşlüdürler (S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). Homojen olmayan lökoplakiler düz ve benekli, beyaz ve kırmızı renkli (eritrolökoplaki), nodüler, ekzofitik veya papiller/verruköz olabilir (S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). İki tip arasındaki ayrım tamamen klinikdir ve homojen olmayan lökoplakilerin çok daha yüksek malin transformasyon riski taşıdığı bilindiğinden bu ayrımın yapılması oldukça önemlidir (Haim, 1981; S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). Histopatoloji lökoplaki iyi huylu keratoz, hiperkeratoz, hiperplazi, displazi veya karsinom olarak olarak sınıflandırır (Bewley ve Farwell, 2017). Genellikle lezyon ne kadar kalınsa örnekte displazi bulma olasılığı o kadar fazladır (Maymone, Greer, Kessecker, ve diğerleri, 2019; Wetzel ve Wollenberg, 2020).



Şekil 2. Lökoplaki Klinik Görünümü. A: (Mustafa, Praveen ve Lesions, 2021) B: (Maymone, Greer, Burdine, ve diğerleri, 2019)

Liken planus; görülme sıklığı yüksek, kronik, inflamatuvar ve mukokutanöz bir hastalıktır (Katz, Brahim ve Travis, 1990; Lacy, Reade ve Hay, 1983; S. Silverman, Gorsky ve Lozada-Nur, 1985). Genellikle cildi, genital bölgeyi, kafa derisini ve tırnakları etkiler, ancak oral mukoza (oral liken planus-OLP) dahil olmak üzere mukozal tutulum da olabilir (Olson, Rogers ve Bruce, 2016). Liken planus ağız mukozasının her bölgesinde görülebilmekte olup birlikte genellikle bukkal mukoza, dil dorsumu ve diş eti etkilenir (Lacy ve diğerleri, 1983). OLP beyazımsı çizgiler (Wickham's çizgileri), beyaz papüller, eritem, erezyon, beyaz plak veya kabarcıklar biçiminde ortaya çıkabilir ve sıklıkla simetrik

ve bilateral veya çoklu lezyonlar olarak görülürler (Şekil 3) (Ismail, Kumar ve Zain, 2007). OLP farklı klinik görünümüne göre 6 tipte sınıflandırılmaktadır. Bunlar: retiküler tip, eroziv tip, annular tip, büllöz tip, atrofik tip'tir (Pindborg, Reichart, Smith ve van der Waal, 1997). İki ana klinik form, retiküler ve eroziv tiplerdir. Retiküler form iki taraflı asemptomatik, beyaz, dantelli çizgiler veya papüller olarak görünür (Gonsalves, Chi ve Neville, 2007). Aşındırıcı formlar, periferik beyaz, yayılan çizgilerle çevrili hassas eritem ve ağrılı ülser alanları olarak kendini gösterir (Gonsalves ve diğerleri, 2007).



Şekil 3. Oral Liken Planus klinik görünümü. (Woo, 2019)

2.2.1. OPML Epidemiyolojisi

Oral premalin lezyonlar dünya nüfusunun yaklaşık %1,5 ila %4,5'inde meydana gelir ve erkeklerde daha fazla gözlenir (Mello ve diğerleri, 2018; Petti, 2003). Farklı tütün ve alkol tüketimi oranları nedeniyle coğrafi farklılıklar bulunduğu için en yüksek görülme oranları Asya, Güney Amerika ve Karayip popülasyonlarında bulundu. Oral premalin lezyonlar, tüm yeni oral kavite kanseri vakalarının %17 ila %35'ini oluşturur ve yılda %0,7 ila %2,9 arasında malin dönüşüme uğrar (S. J. Silverman, Gorsky ve Lozada, 1984; I. Van Der Waal, Schepman, Van Der Meij ve Smeele, 1997). Lökoplaki, oral kavitenin en sık görülen premalin lezyonlarıdır (Yanik ve diğerleri, 2015). Oral lökoplaki prevalansı %1.1 ile %11,7 arasında değişmektedir (Kao, Chen, Chiang, Chen ve Huang, 2009). Eritroplaki prevalansı %0,02 ile %0,83 arasındadır (Bánóczy ve diğerleri, 2001; Kao ve diğerleri, 2009). OSMF, Güney Asya'da özellikle Hintlilerde daha yaygın olarak bulunur (Swain, 2021). OSMF'nin malin transformasyonu %7 ila %30'dur (Swain, 2021). Areca (tembul) somunu çiğnemek, Asya ve Pasifik bölgesinde lökoplaki, OSMF ve ağız kanserinin önde gelen nedenidir (Duan, Liu ve Zeng, 2020). Areca catchu palmye ağacından elde edilen tembul fındık, Güney ve Güneydoğu Asya ve Pasifik'te en yüksek prevalansı ile dünya nüfusunun %10 ila %20'sini oluşturmaktadır (Duan ve diğerleri, 2020).

2.2.2. OPML Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Oral kavitenin premalin lezyonlarının kökeni ile ilişkili birçok etiyolojik faktör vardır (Swain, 2021). Oral kavite premalin lezyonlarının çoğunluğunun kronik sigara içimi, tütün çiğneme ve alkol tüketimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (P. C. Gupta ve Warnakulasuriya, 2002). Oral kavite lökoplaki sigara alışkanlığı olan bireylerde içmeyenlere göre altı kat daha sık görülmektedir (Reichart ve Philipsen, 2005). Kronik alkol tüketimi, lökoplaki ve ağız kanserine neden olmak için önemli bir predispozan faktördür (Isaac van der Waal, 2009). Karsinogenez sürecinde tütünün hem inisiyasyon hem de progresyon aşamasında etkili olduğu bilinmektedir; bununla birlikte, alkolün karsinogeneze etkisi söz konusudur (Isaac van der Waal, 2009). Alkol tüketimi oral lökoplaki riskini 1,5 kat, OSMF riskini iki kat ve eritroplaki riskini üç kat artırır (Hashibe ve diğerleri, 2002; Kruk-zagajewska, 2003; Kumar, Singh ve Suwasini, 2021). Premalin lezyonların etiyolojisi için enfeksiyöz ajanları (Herpes Simplex Virüsü, Epstein Barr Virüsü, Sitomegalovirüs, Herpes Virüsü, Hepatit C Virüsü, İnsan Papilloma Virüsü, Herpes Virüsü-6, Hepatit-C Virüsü, İnsan Papilloma Virüsü), otoimmünite, gıda alerjileri, yaralanmalar, otoimmünite, immün yetmezlik, stres, diyabet, hipertansiyon, malin neoplazm ve bağırsak hastalıkları içeren çeşitli faktörler öne sürülmüştür (Greer, 2006). Hormonal dengesizlik, mide suyunun aşırı salgılanması, tükürük salgısının azalması, Plummer-Vinson Sendromu ve vitamin eksiklikleri gibi sistemik predispozan faktörler ağız boşluğunun premalin lezyonları ile ilişkilidir (Greer, 2006).

OSMF'ye neden olan en güçlü risk faktörü, areca somunu içeren betel sterlinin çiğnenmesidir. Tembul fındık çiğneme, ağız boşluğunun premalin hastalıklarının gelişimi için önemli bir etiyolojidir (Dietrich, Reichart ve Scheifele, 2004). Tembul cevzinin önemli kimyasal bileşenleri polifenoller, tanenler ve alkaloidlerdir. Arecoline, tembul fındıkta bulunan birincil alkaloiddir (P. C. Gupta ve Warnakulasuriya, 2002). Tembul cevzinin uzun süre çiğnenmesi, ağız boşluğunun mukozal astarında kronik tahrişe ve iltihaplanmaya neden olabilir (Swain, 2021). OSMF ile ilişkili diğer faktörler, immünolojik eğilimdir ve OSMF'nin gelişiminde önemli rol oynar (Swain, 2021). OSMF lezyonları genellikle areca cevizi tembul avuçlarının çiğnenmesiyle ilişkilidir (Swain, 2021). Areca somununun alkaloidleri, OSMF'nin patogenezi için çok önemli olan kolajenin birikmesini ve bozulmasını etkiler (Swain, 2021). OSMF'nin malin transformasyonunun vakaların %0,5inde gözlemlendiği bildirilmiştir (Papke, Horenstein ve Stokes, 2015). Aktinik keilit, genellikle ultraviyole radyasyona maruz kalan açık tenli yaşlı erkeklerde görülür

(Tilakaratne, Klinikowski, Saku, Peters ve Warnakulasuriya, 2006). İnsan papilloma virüsü (HPV), oral kavitenin premalin lezyonlarının etyopatogenezinde de rol oynayabilir (Dufresne ve Curlin, 1997). Bir çalışma premalin oral eritroplakide *TP53* mutasyonlarının yüksek prevalansının bulunduğunu bildirdi (Sciubba, 1995).

Oral kandidiyazis veya oral pamukçuk, en yaygını *Candida albicans* olan candida türleri tarafından ağız boşluğunun fırsatçı bir mantar enfeksiyonudur (Swain, 2021). Bu hastalık, ağız boşluğunun premalin bir lezyonu olarak kabul edilir. Akut kandidiyaz, kronik kandidiyaz ve ağız keilit gibi üç çeşit oral kandidiyaz vardır (Swain, 2021). Oral kandidiyaz için risk faktörleri, bozulmuş tükürük bezi fonksiyonu, takma dişler, ilaçlar, yüksek karbonhidratlı diyetler, ileri yaş, sigara ve diyabettir (Qin, Park, Chen ve Lazarus, 1999; Swain, Nahak ve Sahu, 2017).

2.2.3. OPML Tanı, Tedavi ve Önlem

Oral kavitenin premalin lezyonlarının teşhisi genellikle klinik bulgular ve histopatolojik çalışma temelinde yapılır. Fırça sitolojisi/biyopsisi, yalnızca pul pul dökülmüş yüzeysel hücreleri değil, tam bir trans-epitelyal numune elde etmek için bir fırçanın kullanıldığı minimal invaziv bir tekniktir. Bu, lezyonların bazal, orta ve yüzeysel katmanlarının örneklenmesini içeren bir trans-epitelyal teknik olduğundan, karsinoma in situ ile invaziv karsinomu ayırt etmek yardımcı olamaz. Bu tekniğin duyarlılığı %73 ile %100 arasında, özgüllüğü ise %32 ile %94 arasında değişmektedir (Schwartz, Bridges, Butani ve Ehrlich, 2008). Histopatolojik rapor temelinde, lökoplaki displastik veya displastik olmayan tipler olarak bulunabilir. Tanı, displazinin derecesini de değerlendiren biyopsi ile doğrulanır. Histopatolojik olarak eritroplaki orta veya şiddetli displazi gösterir. Aktinik keilitte histopatolojik bulgular epitelde hiperplazi, akantoz veya atrofi, keratin tabakasında kalınlaşma ve/veya hafif-orta dereceli displazi gösterir. Bu epitel değişikliklerine ek olarak bağ dokularında solar elastoz adı verilen kollajen liflerin bazofilik dejenerasyonu bulunur (S. Gupta, Shah, Parikh, Limbdiwala ve Goel, 2014). OSMF'de histopatolojik tanı, subepitelyal dokuları infiltre eden eozinofilik bileşenlere sahip kronik inflamatuvar hücreleri gösterir. Uzun süredir devam eden lezyonlar, azalmış vaskülarite, azalmış inflamatuvar hücre sayısı ve epitelin hemen altında biriken yoğun kollajen tabakaları gösterir.

Sub-epitelyal stromanın yaygın hyalinizasyonu sıklıkla yağlı ve fibrovasküler dokuların yerini alan submukozal dokulara uzanır (de Santana Sarmento, da Costa Miguel,

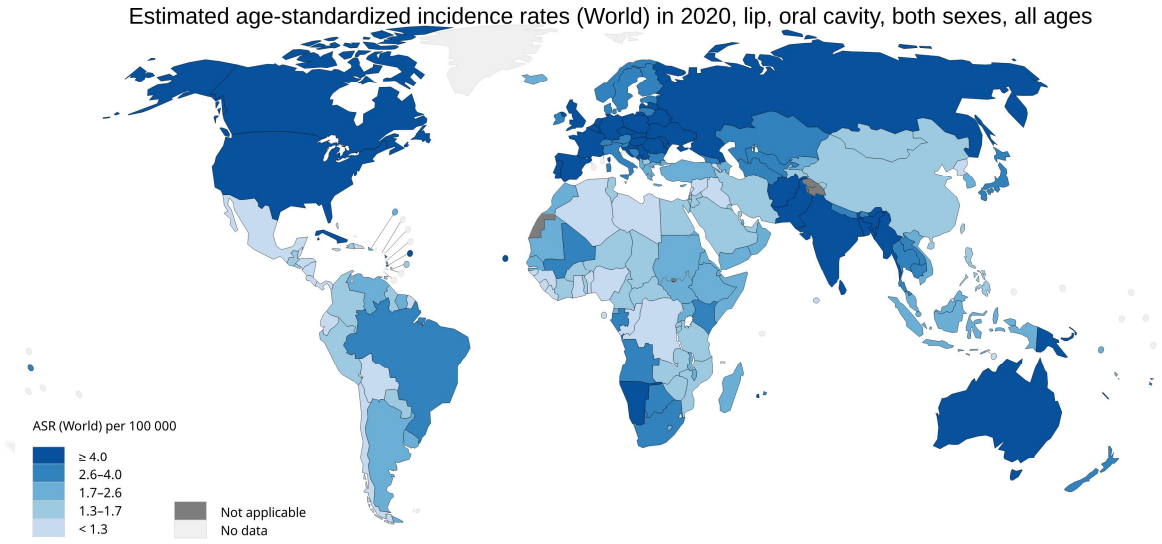
Queiroz, Godoy ve Da Silveira, 2014). Halihazırda dar bant görüntüleme (NBI), premalin ve malin lezyonların saptanmasında yüksek doğruluk göstermektedir. NBI, oral kavitenin premalin ve erken malin bozukluklarının tanısında ve ayrıca tümör invazyonunu değerlendirmede yardımcıdır (Wu, Zhou ve Luo, 2020). Ağız boşluğunun premalin lezyonlarının zamanında teşhis ve tedavisi, ağız boşluğunda skuamöz hücreli karsinom gelişiminin önlenmesinde yardımcı olur (Jayanthi, Probert, Sher ve Mayberry, 1992). Lökoplaki başlangıç aşamasında tedavi edilirse, ağız kanserinin ortaya çıkma şansı olabilir. azaltılabilir. Lökoplaki için çeşitli tedavi seçenekleri olmasına rağmen, lökoplaki'nin malin dönüşümünü en aza indirmek için spesifik ve uygun bir seçenek yoktur. Tedavi seçeneklerinin seçimi, lökoplaki klinik evresine bağlıdır. Histopatolojik çalışmada displazinin varlığı veya yokluğu tedavi yöntemine karar verir. Lökoplaki erken evresinde tedavi prosedürü, tütün, alkolün kesilmesi ve mekanik ve kimyasal yaralanmaların giderilmesi gibi olası etiyolojik faktörlerin ortadan kaldırılmasını amaçlar. Lökoplaki gözlemi için 2 ila 4 haftalık bir süre gereklidir. Etiyolojik faktörlerin ortadan kalkması ile gözlem döneminde lezyonda düzelme olmazsa histopatolojik tanı yapılmalıdır. Tedavi seçimi, ağız boşluğunun lökoplakisinde displazinin varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Herhangi bir düzelme olmadığında veya displazi varlığında cerrahi tedavi gerekir. Oral kavite lökoplakisinin konservatif veya cerrahi olmayan veya medikal tedavisi, kolay uygulama, minimum toksisite veya yan etki içerir ve hastane ortamında tedaviye ihtiyaç duymaz ve hastalar için nispeten düşük maliyetlidir (Swain, 2021). Ağız boşluğunun lökoplakisinin tıbbi tedavisi, A vitamini ve retinoid, karotenoidler, çay ekstresi, bleomisin ve C vitamini gibi kemoprevensiyona dayanır, ancak sonuçsuz olmasına rağmen kullanılmıştır (Swain ve Debta, 2020a). Ameliyatsız olması, iyi kozmetik olması nedeniyle cerrahi olmayan tedavi ağır basmaktadır. sonuç, kümülatif toksisite olmaksızın hasta tarafından iyi tolere edilir ve ameliyattan kaçınıldığı veya kontrendike olduğu durumlarda kullanılır (Swain ve Debta, 2020a). Fotodinamik tedavi adı verilen ve ağız boşluğunun premalin lezyonlarını çıkarmaya yardımcı olan başka bir tedavi seçeneği vardır, çünkü kümülatif yan olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilir (Swain ve Debta, 2020b). Fotodinamik tedavi, oral lökoplaki için son tedavi seçeneklerinden biridir. Işık ve ışığa duyarlılaştırıcı gibi toksik olmayan bileşenlerin yardımıyla oksijen bağımlı bir yöntemle hücre ve doku hasarına neden olur. Bu tedavi tekniği, tümör hücrelerinin belirli bir dalga boyundaki ışığa duyarlı hale getirilmesi için eksojen bir ışığa duyarlılaştırıcının uygulanmasına dayanmaktadır. Foto-duyarlılaştırıcılar genellikle etkisizdir ve sıklıkla

tümör hücrelerine karşı seçici afiniteye sahiptir. OSMF durumunda, fiziksel tedavi fiziksel egzersiz rejimi, splintler veya farklı ağız açma cihazları ve mikrodalga diatermi içerir (Swain, 2021). OSMF'nin steroidler, interferon gama, plasental özler, beta karoten, likopen vitaminleri, aşılınmış süt, kollajenaz, hiyalüronidaz, kimotripsin ve aloevera gibi çeşitli tıbbi tedavileri vardır (Alam ve diğerleri, 2013).

Ağız boşluğunun premalin lezyonlarını kontrol altına almanın önemli kısmı, her zaman hastaya tembul fındık çiğneme, gutkha çiğneme, sigara ve alkol tüketimi alışkanlıklarını bırakmasını tavsiye etmektir (Swain, Sahoo ve Panda, 2020). Premalinin erken tespiti için ağız boşluğunun toplu taraması yapılmalıdır. Ağız boşluğunun bu tür premalin lezyonlarını önlemek için yaşam tarzını değiştirmek için yoğun bir halk eğitimi olmalıdır. Tütün ürünleri ve alkol üretiminin kontrolü veya yasaklanması, satışının kısıtlanması gibi yasal tedbirler kesinlikle uygulanmalıdır. Klinisyenler tarafından yapılan uygun danışmanlık, tütün bağımlılığını bırakmaya büyük ölçüde yardımcı olur. Tedaviden sonra ağız boşluğunun premalin lezyonlarının tekrarlama olasılığı vardır, bu nedenle hastanın izlenmesi gerekir (Swain, 2021).

2.3. Oral Kavitenin Kanserle İlişkisi

Dünya çapında malinite sıralamasında 16. sırada olan oral kavite kanserleri (OCC) baş-boyun kanserleri içerisinde katagorize edilmektedir (Sung ve diğerleri, 2021). 2020 verilerine göre dünya çapında dudak ve oral kavite kanserleri 377.713 yeni vaka ve 177.717 mortaliteden sorumludur (Şekil 6). Oral kavite kanserlerinin %90'ından fazlası skuamöz dokulardan meydana geldiği için genel olarak oral kavite skuamöz hücreli karsinom (OSCC) olarak yaygınlaşmıştır (Rivera, 2015; Saman Warnakulasuriya, 2009). Oral mukozayı tutan diğer maliniteler, minör tükürük bezlerinin malin tümörleri, malin melanom ve rabdomiyosarkom, fibrosarkom, leiomyosarkom veya karsinosarkom, Kaposi sarkomu ve lenfoma gibi nadir ağız içi sarkomlardır (Walker, Boey ve McDonald, 2003). Skuamöz hücreli kanserin en erken formuna karsinoma in situ denir. Bu, kanser hücrelerinin yalnızca epitel (ağız boşluğunu ve orofarenksi kaplayan hücrelerin üst tabakası) adı verilen hücre katmanında olduğu anlamına gelmektedir. Bu, kanser hücrelerinin epiteli geçerek ağız boşluğunun veya orofarenksin daha derin katmanlarına doğru büyüdüğü invaziv skuamöz hücreli kanserden farklıdır (*American Cancer Society 2022*).



Şekil 4. Oral Kanserlerin Dünya Nüfusu Üzerinde Dağılımı (Sung ve diğerleri, 2021).

2.3.1. Dil Tümörleri

Dil bölgesinde meydana gelen oral kanserler, oral kavite kanserleri arasında en yaygın gözlenen anatomik bölgedir (Rusthoven, Ballonoff, Raben ve Chen, 2008). Amerika Birleşik Devletlerinde 2021 yılı içerisinde 17,960 yeni vaka gözlenmiştir ve tüm kanserlerde gözlenen yeni vaka sayısının %0,9'luk bir dilimini kapsamaktadır. Mortalite oranı 2021 yılı içinde tüm kanser ölümlerine oranla %0,5'tir. Oral dil kanserleri için 5 yıllık survi sağkalım %68,1'dir (National Cancer Institute, 2022). Oral dil skuamöz hücreli karsinomu (OTSCC), başlıca iki nedenden dolayı ayrı bir alt bölge olarak kabul edilmiştir. Birincisi, dil oral kavitenin zengin bir lenf ağı olan tek kısmıdır ve kaslarında fasya veya kemik yoktur ve tümörün yayılmasını önlemek için kapsüllenmemiştir. Malin hücreler, karmaşık arteriyovenöz drenaj ve nörovasküler demetlerle beslenen yumuşak kas liflerinden kolayca geçer (Shetty, Kudpaje, Jayaraj, Rao ve Shah, 2019). OTSCC, oral kavitenin diğer bölgelerindeki karsinomlardan daha kötü bir prognozla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Rusthoven ve diğerleri, 2008). Dil kanseri erkeklerde kadınlara göre daha sık görülmektedir. Alkol ve tütün türevlerinin kullanılması ve insan papilloma virüsü (HPV), özellikle HPV 16 ile enfekte olunması bu kanserle ilişkilidir (National Cancer Institute, 2022).

2.3.2. Dudak Tümörleri

Dudak kanseri, oral kavite kanserleri arasında yer alan klinik görünümü cilt kanserine benzeyen malin bir tümördür. İnsidans oranları Okyanusya'da 100.000'de 13,5,

Avrupa'da 100.000'de 12 ve Kuzey Amerika'da 100.000'de 12,7 civarındadır (Czerninski, Zini ve Sgan-Cohen, 2010). Dudak kanserinde risk faktörü olarak güneş ışınlarına maruziyet, tütün tüketimi ve virüsler yaygın olarak görülmektedir. Tümörlerin yaklaşık yüzde 90'ı alt dudakta, yüzde 7'si üst dudakta ve yüzde 3'ü oral komissürde ortaya çıkar. Dudak kanserlerinde en sık görülen histolojik tümör tipleri skuamöz hücreli karsinom ve bazal hücreli karsinomdur. Dudak kanserinin en yaygın mukozal olmayan formu, minör tükürük bezlerinin tümörlerinden kaynaklanır ve mukozal dudak kanserinin tersine üst dudakta alt dudağa göre daha sık tutulum gözlenir. Mukozal dudak kanserini kutanöz dudak kanserinden ayırt etmek önemlidir, çünkü ikiside farklı patofizyoloji ve prognostik etkilere sahiptir (Kerawala, Roques, Jeannon ve Bisase, 2016). Mukozal dudak kanserleri, ince bir mukoza epiteline sahip olan ve kılcıl damarlar ve minör tükürük bezlerinden zengin olan iç vermilyon veya ıslak dudaktan kaynaklanır. Buna karşılık, kutanöz dudak veya dış vermilyon, baş ve boyun derisinin geri kalanına benzer şekilde kalın keratinize edici bir epidermis gösterir. Her iki dudak kanseri türü de bir risk faktörü olarak güneş maruz kalmayı paylaşır; ancak tütün ve alkol kullanımı da mukozal dudak ve ağız boşluğu kanserleri için risk faktörleridir (Ellington ve diğerleri, 2020; Howard, Agrawal ve Gooi, 2021).

2.3.3. Bukkal Mukoza Tümörleri

Bukkal mukoza, oral vestibülün anterolateral sınırlarını oluşturan yanakların ve dudakların mukozal yüzeylerinden oluşur. Ağız tabanını ve alveolar sırtları kaplayan mukoza ile bitişiktir. Bukkal mukozanın yanı sıra bitişik oral mukozanın diğer kısımlarında yer alan yaklaşık 800-1000 minör tükürük bezi vardır. Stensen (parotis) kanallarının ostiumları, ikinci maksiller azı dişlerinin karşısında parotis papillalarında bukkal mukoza içinde yer alır. Bukkal mukozanın karsinomları genellikle alt azı dişlerine bitişik yan duvarlarda ortaya çıkar. İlerleme yollarından biri gingivobukal oluklardır ve nihayetinde gingiva ve kemiğin invazyonu ortaya çıkabilir. Alternatif olarak, buccinator kasını istila edebilir, bukkal yağ yastığına uzanabilir ve subkutan dokuları istila edebilirler. Daha ileri tümörler parotis bezini ve yüz sinirini bile tutabilir. Tanı anında klinik nodal pozitiflik olasılığı yaklaşık %10-30, subklinik hastalık riski ise %5-15 arasındadır (Jacobs ve diğerleri, 2018).

2.3.4. Retromolar Trigon Tümörleri

Retromolar trigon (RMT), son mandibular molar dişlerin hemen arkasındaki üçgen yumuşak doku bölgesidir ve RMT lateralde bukkal mukoza ve medialde anterior tonsiller pillar ile bağlı olması sebebiyle bukkal mukoza olarak sınıflandırılır (Genden, Ferlito, Shaha ve Rinaldo, 2003; Nishi, Shinozaki, Tomioka, Maruo ve Hayashi, 2018). Retromolar trigon bölgesinin tümörleri oral kavite neoplazmalarının %12'sini temsil eder (Aloua, Opoko, Kerdoud, Hmoura ve Slimani, 2021). Vakaların çoğunda (>%95) skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, adenoid kistik karsinom ve nadir görülen mukoeptidermoid karsinom şeklinde gözlenirler (Mazziotti ve diğerleri, 2014). Retromolar trigonun skuamöz hücreli karsinomu erken dönemde kemik infiltrasyonu, lenf nodu metastazı ve infratemporal fossaya infiltrasyon ile sonuçlandığından prognozu bademcikler, ağız tabanı ve diş etleri gibi komşu bölgelerdeki skuamöz hücreli karsinomdan daha kötüdür (Mendenhall ve diğerleri, 2006; Shaw ve diğerleri, 2009). RMT tümörleri, hasta semptomatik hale gelene kadar oldukça uzun bir süre uykuda kalabildikleri için tümörün histolojik özellikleri prognoz açısından oldukça önemlidir (Genden ve diğerleri, 2003).

2.3.5. Ağız Tabanı Tümörleri

Ağız tabanı, SCC'nin ortaya çıktığı en yaygın ikinci alt bölgedir. 2 cm'den küçük tümörler genellikle asemptomatiktir ve eritemli bir kitle olarak görünebilir. Lezyonlar büyüdükçe ve ülserleştikçe, dilin köküne veya lingual veya mental sinirlere uzanım meydana gelebilir, bu da dil hareketliliğinin azalması ve dişlerde, dudakta ve çenede duyu azalması nedeniyle disfaji ve dizartri ile sonuçlanır. Bu bölgeden kaynaklanan daha ileri kanserler, mandibulaya dayanabilir veya invaze edebilir (A. Y. Chen ve Myers, 2000).

2.3.6. Alt ve Üst Damak Bölgesi Tümörleri

Sert damak tümörleri nadirdir ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki tüm ağız kanserlerinin sadece %0.5'ini oluşturur. Çoğu karsinom, sert damağın granüler yüzeysel ülserasyonu olarak kendini gösterir. İlk büyüme yüzeysel olma eğilimindedir, ancak bu tümörler kemiğin periostundan, paranazal sinüsler ve burun tabanı gibi ağız boşluğuna bitişik bölgelere yayılabilir (A. Y. Chen ve Myers, 2000).

2.3.7. Alveolar Ridge Bölgesi Tümörleri

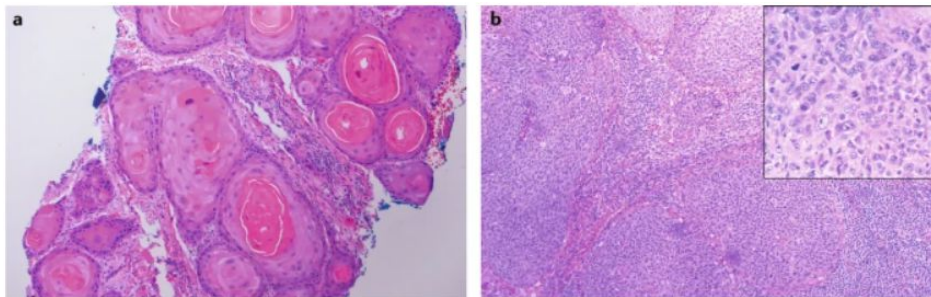
Üst ve alt çenenin alveolar sırtını kaplayan mukoza, alttaki kemiğe ve dentat bireylerde dişlerin kök yüzeyine sıkıca tutunur. Alt çenede, lingual olarak ağız tabanı ve bukkal olarak bukkal mukoza ile sınırlanan retromolar alana soldan sağa doğru uzanır. Üst çenede lateral sınırı, palatal tarafında bukkal mukozaya geçiştir, keskin bir anatomik sınır yoktur, alveolar mukoza sert damağı kaplayan mukozal astarla birleşir. Dorsal olarak, üst alveolar sırtın mukozal astarı da retromolar alanla sınırlanmıştır (Slootweg ve Richardson, 2009). Alveolar sırtın SCC'si, dudak kanseri de dahil olmak üzere tüm intraoral kanserlerin %7 ila %18'ini oluşturur (Barnes ve Johnson, 1986). Bu bölgedeki tümörler ülserli veya ekzofitik olabilir. Doğal olarak kemiğe sıkıca bağlı bölgelerde ortaya çıktıklarından, bu konumdaki tümörler her zaman kemiğe sabitlenir (Slootweg ve Richardson, 2009).

2.4. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC)

2.4.1. OSCC Histopatolojisi

Skuamöz hücreli karsinomlar (SCC'ler), klinik muayenede koyu ten rengi veya beyaz tümörler olarak görünür. Histopatolojide SCC iyi, orta ve skuamöz farklılaşma düzeyine göre kötü farklılaşmış olarak sınıflandırılır (Şekil 7). İyi farklılaşmış SCC, belirgin hücreler arası köprülere, diskeratotik skuamöz hücrelere ve keratin incilerine sahiptir. Kötü farklılaşmış SCC, morfolojik olarak minimal skuamöz farklılaşma gösterir. Orta derecede diferansiye SCC, iyi diferansiye SCC'ye göre tümörün daha küçük bir kısmında skuamöz farklılaşma kanıtı gösterir (Bahadur ve Iyer, 2021).

WHO sınıflandırmasında SCC'nin altı histolojik varyantı kabul edilmiştir ve bu varyantlar toplamda tüm skuamöz hücreli karsinomların (SCC) yaklaşık %10-15'ini oluşturmaktadır. Bu varyantlar arasında verrüköz karsinom (VC), adenoid SCC (AdSCC), iğsi hücre/sarkomatoid karsinom (SCSC), adenoskuamöz karsinom (ASC), bazaloid SCC (BSCC) ve papiller SCC (PSCC) bulunur (Thompson, 2003).



Şekil 5. OSCC'nin Histopatolojisi. A) Yarı organize keratinizasyona sahip olgun hücreleri gösteren oral dilin iyi farklılaşmış skuamöz hücreli karsinomu. B) Dil tabanının kötü farklılaşmış skuamöz hücreli karsinomu. (Johnson ve diğerleri, 2020).

2.4.2. OSCC Epidemiyolojisi

Oral kavite kanserleri Güneydoğu Asya'da (Hindistan, Sri Lanka, Pakistan, Bangladeş ve Tayvan) ve Pasifik bölgelerinde (Papua Yeni Gine ve Melanezya) en yaygın gözlenen malinedir (Rivera, 2015). Dünya çapında, her sene yaklaşık 275.000 oral kavite kanseri teşhis edilmektedir ve %90'ını gibi büyük bir çoğunluğunu skuamöz hücreli karsinom (OSCC) oluşturmaktadır (Bray, Ren, Masuyer ve Ferlay, 2013; Funk ve diğerleri, 2002). OSCC genç nesile oranla daha çok 40'lı yaşlardan sonraki kişilerde ve erkeklerde kadınlardan daha yüksek bir oral kavite kanseri prevalansı gözlenmektedir ancak kadınlarda tütün kullanımının arttığı bölgelerde bu durum değişmektedir (Nocini, Lippi ve Mattiuzzi, 2020). Coğrafi konum ve yaşam standartlarına göre teşhis edilen vaka ve ölüm sayıları değişiklik göstermektedir. Asya Kıtası, teşhis edilen vakaların (%64.2) ve mortalitenin (%73.3) en yüksek yüzdesine sahipken, Okyanusya teşhis edilen hastaların (%1.3) ve mortalitenin (%0.56) en düşük yüzdesine sahiptir (Sarode ve diğerleri, 2020).

2.4.3. OSCC Risk Faktörleri ve Etiyoloji

Ağız kanseri vakalarının çoğu, yaşam tarzı davranışlarına, sosyo-ekonomik durumlara, bireysel olarak yatkınlık durumuna ve maruz kalma ile bağlantılıdır. Ağız kanserinin en önemli nedenleri uzun yıllar devam eden alkol tüketimi, tütün kullanımı (sigara ve dumansız), yüksek riskli insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu ve kötü ağız hijyenidir. Diyetteki mikro besin eksikliği, çevresel faktörler, genetik faktörler vb. ağız kanseri gelişimi riskini etkileyen diğer önemli faktörlerdir (Garnis, Campbell, Zhang, Rosin ve Lam, 2004; Gillison ve diğerleri, 2000).

2.4.3.1. Tütün ve Türevlerinin Kullanımı

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından sigara, pipo ve puro gibi tütün ürünlerinin içilmesi ve pasif içicilik (dumanının solunması) insanlar için kanserojen olduğu belirtilmiştir (IARC, 2004). Tütüne özgü nitrozaminlere (TSNA) ve tütün çiğnenirken reaktif oksijen türleri (ROS)'ne maruz kalma, ağız kanseri oluşma olasılığını daha da artırır. Örneğin, benzo- α -pirenler, oksitleyici enzimler (özellikle sitokrom P450) tarafından metabolize edilen ve doğası gereği yüksek oranda reaktif ve kanserojen olan oluşum ara ürünleriyle sonuçlanan tütün dumanı kanserojen maddeleridir (Sharma, Anil Kumar, Indu, Gautami ve Varruchi, 2020).

2.4.3.2. Alkollü İçecek Tüketimi

Düzenli alkol tüketimi, tüketilen alkol miktarına bağlı olarak ağız kanserine yol açabilir (Sharma ve diğerleri, 2020). Günde 4-5 bardak alkol tüketimi ile bireyler, içmeyenlere göre daha yüksek ağız kanserine yakalanma oranına sahiptir (Gillison ve diğerleri, 2000). Alkolün genel olarak alkol dehidrojenaz ve aldehit dehidrojenaz olarak adlandırılan iki ana metabolize edici enzim tarafından metabolize edildiği bilinmektedir (Sharma ve diğerleri, 2020). Alkol dehidrojenaz temel olarak etanolü asetaldehite oksitlerken, diğer yandan aldehit dehidrojenazın asetaldehiti asetata detoksifiye ettiği bildirilmektedir (Sharma ve diğerleri, 2020). Asetaldehitin mutajenik yapısı nedeniyle oral kanserojen etkilere sahip olduğu düşünülmektedir (Sharma ve diğerleri, 2020). Ayrıca alkol ürünleri içerisinde etanol dışında polifenoller, akrilamid ve nitrozaminler gibi kanserojen olarak sınıflandırılan bileşenler bulunmaktadır (IARC, 2004).

2.4.3.3. Betel Quid ve Areca Nut Çiğnenmesi

Oral karsinogenezin arkasındaki bir diğer önemli etiyolojik faktör, betel quid ve areca nut çiğnenmesidir. Dünyanın birçok yerinde, özellikle Güney Asya ve Güney Doğu Asya'da, betel quid (areca nut ve betel yaprağına sarılmış kireçten oluşur) çiğneme alışkanlıkları yaygın olarak görülür ve sosyokültürel bir gelenek olarak kabul edilir (Guha, Warnakulasuriya, Vlaanderen ve Straif, 2014). Uzun yıllar betel quid çiğnenmesinin ağız kanserine yakalanma riskini arttığı bildirilmiştir (Anand, Dhingra, Prasad ve Menon, 2014). Betel quid, kanserojen nitrozaminler ve ağız boşluğunda ROS üretimi ile kanserojen sürece aracılık eder (Nair, Bartsch ve Nair, 2004). Aşırı ROS üretimi, areca nut'ta bulunan polifenollerin oto-oksidasyonundan kaynaklanır. Sadece areca nut çiğnemenin bile ağız kanseri için ciddi oranda önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Y. C. Li ve diğerleri, 2016). Betel quid ağızda daha uzun süre tutmanın riski daha fazla artırdığına dikkat çekilmiştir (C. P. Wen ve diğerleri, 2010).

2.4.3.4. Human Papilloma Virüs (HPV)

Insan papilloma virüsü (HPV), iyi huylu ve kötü huylu oral karsinom ile ilişkili ana etiyolojik faktörlerden biridir (Sharma ve diğerleri, 2020). HPV'nin etkisi kondilomlar, skuamöz hücreli papillom, fokal epitel hiperplazi ve kötü niyetli oral aşınma dahil olmak üzere birçok kanserojen durumda yapılan çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Thavarajah ve Ranganathan, 2017). HPV viral insidansı en yüksek %59 oranla oral kavite kanserinde gözlenmektedir, bunu faringeal (%43) ve laringeal (%33) karsinomlar takip etmektedir

(IARC, 2004). İnsan papilloma virüsleri arasında HPV16 ve HPV18, insan epitel dokularını istila edebilen ve ağız kanserine neden olabilen yüksek riskli HPV'ler olarak tanımlanmıştır (Sharma ve diğerleri, 2020). Virüs, konak hücreyi istila ettiğinde E6 ve E7 onkoproteinlerinin ekspresyonunu artırır (Sharma ve diğerleri, 2020). Upregüle edilmiş E6 proteini G1 fazındaki hücreleri durdurduğu ya da programlanmış hücre ölümünü ya da apoptozu indüklediği ve böylece konakçı DNA'nın onarılmasına izin veren p53'ün aktivitesinin kaybına sebep olur (Sharma ve diğerleri, 2020). Öte yandan, E7 proteini, retinoblastom tümör baskılayıcı gen ürünü pRB'ye bağlanarak onu inaktif hale getirir, böylece hücrenin S-fazına girmesine ve hücre döngüsünde bozulmaya neden olur (Jayalekshmi ve diğerleri, 2009).

2.4.3.5. Ağız Hijyeni

Kötü ağız hijyeni, olumsuz sosyal etkileşimin yanında ağız kanserinin büyümesi ve gelişmesi için kilit risk faktörlerinden biridir. Kötü ağız hijyeninin yanında dişlerde çürük gibi çeşitli diş hastalıklarının baş ve boyun kanseri riskini daha da artırdığı bilinmektedir (Kerbel, 2000). Sağlıklı bireylerin oral mukozasında bulunan mikrobiyal popülasyonda meydana gelen değişiklikler oral karsinogeneizde rol oynamaktadır (Sharma ve diğerleri, 2020). Oral mikrobiyotada bulunan bakteri popülasyonu apoptozu engelleyebilen hücresel proliferasyonu indüklemeye mekanizmasına sahiptir (Sharma ve diğerleri, 2020). Bu yetenekleri sayesinde tümör oluşumunu teşvik edebilir veya oral biyofilmlerin oluşumuna yol açabilir (Khuri ve diğerleri, 2000).

2.4.3.6. Besin Tüketimi

Sağlıksız bileşenlerden oluşan diyetin yanı sıra herhangi bir fiziksel aktivite olmaksızın yerleşik yaşam tarzı ve günümüzde ekonomik durum sebebiyle artan obezite vakalarının küresel kanser oranlarının yaklaşık %40'ına katkıda bulunduğu bilindiğinden diyet faktörlerinin kanser insidansı üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Oral kanser vakalarının yaklaşık %15'i meyve ve sebzelerin düşük oranda tüketilmesi ile ilişkilendirilmiştir (Lemaire ve diğerleri, 2003). Meyve ve sebzelerde bulunan bileşenlerin tüketiminin azlığı ile oral kanser arasındaki bağlantıyı destekleyici nitelikte az sayıda araştırma bulunmaktadır ve bu besinlerin oral kanserdeki kesin rolleri ve mekanik ayrıntıları netlik kazanmamıştır. Literatürdeki bazı çalışmalar, bitkiden elde edilen sekonder metabolitlerin ve fitokimyasalların (vitaminler, flavonoidler, karotenoidler vb.) potansiyel antioksidan ve anti kanserojen özelliklere sahip olduğunu ve diğer etiyolojik

faktörlerin neden olduğu olumsuz kanserojen etkilerinin ortadan kaldırılması için önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Sharma ve diğerleri, 2020).

2.4.4. OSCC Evrelemesi ve Hastalığın Seyri

Baş ve boyun malinitesi açısından değerlendirilen tüm hastalar Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) sistemine göre evrelendirilmektedir (Tablo 1) (Lydiatt ve diğerleri, 2017). Bu sistemde temel olarak primer tümörün boyutu ve yakın bölgeye yayılımı T ile, boyundaki lenf nodlarının boyutu ve sayısı N ile ve metastaz olup olmadığı bilgisi M ile gösterilmesi temeline dayanmaktadır (Lydiatt ve diğerleri, 2017). Evreleme çok yönlü bir süreçtir ve hasta için uygun tedaviyi seçmeye yardımcı olur (Ettinger, Ganry ve Fernandes, 2019).

Tablo 1. Oral Kavite Tümörleri TNM Evrelemesi (T:Primer lezyonu, N: Bölgesel lenf nodu tutulumunu, M: Metastaz) (Edge ve Byrd, 2018).

T Kategorisi	Kriter
TX	Primeri tespit edilemeyen tümör
Tis	İn situ karsinom
T1	Tümör ≤2 cm, 5 mm den az derin invazyon(DOI)
T2	Tümör≤ 2 cm, DOI>5 mm ve ≤10 mm veya tümör>2 cm ve ≤4 cm, DOI≤10 mm
T3	Tümör>4cm veya herhangi boyutta tümör ve DOI>10 mm
T4	Orta, ileri ve çok ileri lokal hastalık
T4a	Orta, ileri lokal hastalık: (dudak) Tümör kortikal kemiği invaze etmekte veya inferior alveoler sinir, ağız tabanı, yüz cildi tutulmuş; (oral kavite) tümör sadece bitişik yapılara invaze (mandibula ve maksilla kortikal kemik tutulumu, maksiller sinüs veya yüz cildine uzanım), diş soketinden girerek kemik invazyonu yapan gingiva tümörleri T4 grubuna girmez
T4b	Çok ileri lokal hastalık; tümör mastikatory boşluk, pterygoid plateler, kafa tabanını tutmuş ve/veya internal karotis arter invazyonu var ise
NX	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Aynı tarafta en büyük boyutu ≤ 3 cm olan tek lenf nodu metastazı ve ektrakapsüler yayılım (-)
N2	Aynı tarafta en büyük boyutu > 3 cm ancak ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı ve ektrakapsüler yayılım (-) veya aynı tarafta boyutu ≤ 6 cm olan birden fazla lenf nodu metastazı ve ektrakapsüler yayılım (-) veya bilateral ya da karşı tarafta boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı ve ektrakapsüler yayılım (-)
N2a	Aynı tarafta en büyük boyutu > 3 cm ancak ≤ 6 cm tek lenf nodu metastazı ve ektrakapsüler yayılım (-)
N2b	Aynı tarafta boyutu ≤ 6 cm olan birden fazla lenf nodu metastazı ve ektrakapsüler yayılım (-)
N2c	Bilateral ya da karşı tarafta boyutu ≤ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı ve ektrakapsüler yayılım (-)
N3	Boyutu ≥ 6 cm lenf nodu metastazı ve ektrakapsüler yayılım (-) veya klinik olarak tespit edilebilen ektrakapsüler yayılımın olduğu herhangi bir lenf nodu metastazı
N3a	Boyutu ≥ 6 cm lenf nodu metastaz(lar)ı ve ektrakapsüler yayılım (-)
N3b	Klinik olarak tespit edilebilen ektrakapsüler yayılımın olduğu herhangi bir lenf nodu metastazı
M0	Metastaz yok
M1	Metastaz var

Prognoz, lezyonun üç ana faktörüne; tümörün konumuna, lenf düğümlerine metastaz olup olmamasına ve tümörün boyutuna göre değişiklik göstermektedir (Cardesa, Slootweg, Gale ve Franchi, 2017). Boyun lenf düğümlerine metastaz sıktır ancak uzak organ metastazı nadirdir. Uzak metastaz durumunda genellikle karaciğer ve kemik tutulumu gözlenir. Metastaz genellikle ilerlemiş, lokalize kanser veya nüks edenlerde görülür. Ağız boşluğunun arkasında, boğazda ve alt kısımda meydana gelen ağız kanserleri, bu tümörler genellikle ileri evrelerde teşhis edildiğinden ve teşhis edildiğinde lenf düğümlerini istila etme olasılıkları daha yüksek olduğundan daha kötü bir prognoza sahiptir (Mishra, 2019). Çoğu ağız kanseri için teşhis, hastalık ilerlediğinde ve hastalığın semptomları artmaya başladığında yapılmaktadır (Regezi, Sciubba ve Jordan, 2016), bu da kişinin iyileşme şansını büyük ölçüde azaltır (Cardesa ve diğerleri, 2017).

2.4.5. OSCC Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Erken evrelerde lezyonlar semptomsuz olma veya semptom gösterememesine rağmen ilerlemiş tümör evresine sahip kanser hastalarında iyileşmeyen belirgin bir ağrı, dudaklarda, ağızda veya yanakta bir yumru veya kalınlaşma, yutma, çiğneme ve yeme güçlüğü, çeneyi veya dili hareket ettirmede sorun, ağız bölgesinde uyuşma, kırmızı veya beyaz lezyonlar, ses kısıklığı ve ağız kokusu en yaygın belirtiler olarak görülmektedir (National Cancer Institute, 2021). Ağız boşluğunda malin tümörlerin varlığını doğrulamak için kullanılan tanı yöntemleri arasında sitoloji ve fırça biyopsisi (oralCDx Fırça Testi), ince iğne aspirasyonu, toludin mavisi ile boyama, görselleştirmeye dayalı ek teknikler (optik koherens tomografi ve otofloresan tekniği) ve görüntüleme (bilgisayarlı tomografi vb.) teknikleri yer alır (Mehrotra ve Gupta, 2011).

Görüntüleme teknikleri, primer tümörün kapsamını, bölgesel lenf düğümü yayılımını ve uzak metastazı belirlemeye yardımcı olur. Oral kavite ve orofarenks anatomik bölgeleri genellikle görsel muayeneye (transoral veya endoskopik olarak) uygun olduğundan ilk tanı ve evreleme için klinik muayeneye başvurulur.

Oral ve orofaringeal kanserlerinde tümörün tam değerlendirilmesi ve evrelemesi için en yaygın gelişmiş kontrastlı ve kontrastsız bilgisayarlı tomografi (CT) baş ve boyun taramasını, manyetik rezonans görüntülemeyi (MRI) veya kaynaşmış CT/pozitron emisyon tomografisini (CT/PET) içerir (Rumboldt, Gordon, Gordon, Bonsall ve Ackermann, 2006). Uzak metastaz riski taşıyan hastalar için, düz radyografi veya toraks BT'sinin yanı sıra tüm vücut BT/PET'i gerekebilir (Chi ve diğerleri, 2015).

Erken evre OSCC'ler genellikle tanım olarak boyutları 2 cm'den küçük ve derin (dışsal) dil kaslarını veya mandibula içermemeleri sebebiyle herhangi bir radyolojik incelemelerde belirgin değildir. Bununla birlikte, T2 kanserleri 2 ila 4 cm büyüklüğündedir ve daha yüksek gizli lenf nodu metastazı insidansına sahiptir. Bu nedenle, bölgesel lenf düğümlerini değerlendirmenin yanı sıra birincil tümörün yaygınlığını değerlendirmek için ek görüntüleme gereklidir. BT, hızlı görüntü alımı ve kemik tutulumunun mükemmel çözünürlüğünü sağlar. MRI, lokal yumuşak doku invazyonu, perinöral invazyon ve kemik iliği tutulumunun derecesini karakterize etmede üstündür (Law, Chandra, Hoang ve Phal, 2011). Özellikle dil kanserleri için, MRG primer tümörün yaygınlığını (tümörün orta hattı geçip geçmediği dahil), derin kas invazyonu ve rezektabiliteyi belirlemek için en iyi yöntemdir (Arya, Chaukar ve Pai, 2012). Ayrıca, dil tümörü kalınlığının preoperatif değerlendirilmesi için MRI'a alternatif olarak intraoral ultrason kullanılmaktadır (Yesuratnam ve diğerleri, 2014). Gelişmiş OSCC'ler (evre III ve IV), hem T hem de N evrelemeye yardımcı olmak için kontrastlı ve kontrastsız baş ve boyun BT'sini gerektirir. Şiddetli ağrı veya trismuslu hastalarda sinir tutulumu (lingual, hipoglossal) veya pterygoid kas invazyonu olabilir ve bu da bu tür görüntüleme için bir gösterge olabilir.

Tedavi seçenekleri cerrahi, radyasyon ve kemoterapiyi içerir. Transoral lazer ve mikrocerrahi herhangi bir primer fonksiyon kaybına yol açmaz ve rezektabl oral skuamöz hücreli karsinom için etkili bir şekilde kullanılabilir (Scully ve Bagan, 2008). Cerrahi; önleyici veya profilaktik cerrahi, tanısal cerrahi, evreleme, küratif, kitle azaltıcı veya sitoredüktif, palyatif, destekleyici, onarıcı veya rekonstrüktif cerrahi gibi çeşitli amaçlarla yapılabilir (Shah ve Gil, 2009).

Radyoterapi, iyonlaştırıcı radyasyonun kullanımını içerir. Hücrelerdeki DNA'yı değiştirerek büyümelerini ve çoğalmasını durdurarak hedeflenen tedavi alanındaki hücreleri yok ettiği bilinmektedir (Baskar, Lee, Yeo ve Yeoh, 2012). Bunun öncesinde, bilgisayarlı aksiyal tomografi (CAT) tarama resimleri ve tedavi için ele alınması gereken ölçüm alanlarının yanı sıra daha sonraki tedavi önlemleri sırasında yerini belirlemeye yardımcı olmak için hastanın cildinde uzun süreli işaretlerden oluşan simülasyon gerçekleştirilir. Radyasyon tek başına uygulanabildiği gibi cerrahi veya kemoterapi ile birlikte de yapılabilir. Yan etkiler arasında kısa süreli veya kalıcı saç dökülmesini, tedavi edilen parçanın cilt rengindeki değişiklikleri, cilt tahrişini ve kalıcı tükürük fonksiyonu

kaybının sebep olduğu kserostomi olabilir (Kossatz ve diğerleri, 2016). Bu tür yan etkilerden kaçınmak için yeni teknikler üzerinde çalışılmaktadır. Tükürük bezlerinin zarar görmesini engelleyebilecek bu tekniklerden biri IMRT'dir (Yoğunluk Ayarlı Radyoterapi) (Brennan, Bradley ve Brands, 2017). Radyo-duyarılaştırıcıların, tümör hücrelerini yok etme olasılığı yüksek olduğu bilinmekle birlikte normal hücreleri ve dokuları radyasyonun yıkıcı etkilerinden de koruduğu bildirilmiştir. Son zamanlardaki bir başka yaklaşım, radyasyon dozlarını kanser bölgelerine ileten radyoetiketli antikörlerin kullanıldığı radyoimmünoterapidir. Bunun yararı, sağlıklı dokulara ve hücelere radyasyon zararı olasılığını azaltmasıdır.

Kemoterapi, büyüme kabiliyetini etkileyerek kanserli hücreleri yok etmek için kimyasalların kullanılmasını içerir. Kemoterapinin başlıca avantajı, sınırlı bir alandaki kanseri tedavi eden diğer yaklaşımlardan farklı olarak metastatik kanseri tedavi etmek için kullanılabilmesidir. Kemoterapide kullanılan ilaçlar, hücre yaşam döngüsüne saldırır ve hücrelerin yapısını değiştirerek çoğalmalarını veya yeni DNA ipliklerinin sentezinin engellemesini veya kanserli hücrelerin mitotik süreçlerini sonlandırmasını sağlayarak kanserli hücrelerin DNA'sına etki eder. Nitrozoüreler, antitümör antibiyotikler, antimetabolitler, alkilleyici ajanlar, steroid hormonları ve bitki alkaloidleri kemoterapide kullanılan ana ilaç kategorileridir.

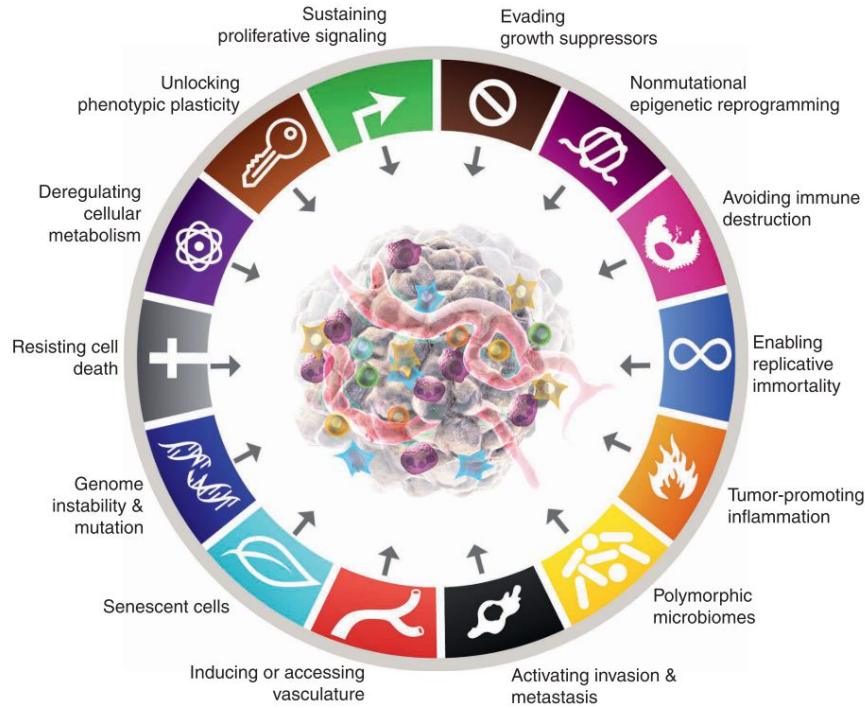
Transoral Robotik Cerrahi (TRS), kemoterapiden daha az toksisite ve organ koruması ile cerrahi bir alternatif olarak düşünülebilir (Kalavrezos ve Bhandari, 2010). Ağız kanseri tedavisi gören hastaların daha önceki kötü yaşam alışkanlıklarına geri dönmemesi ve yaşam kalitesinin devamı için daha fazla desteklenmesi gerekmektedir (Rogers, 2010).

2.5. Oral Kavite Tümörlerinin Moleküler Biyolojisi

2.5.1. Oral Karsinogenez

Karsinogenez, bir hücrenin malin olarak tanımlanmasıyla sonuçlanan genotipik ve fenotipik değişiklikler dizisini tanımlar. Normal hücrelerle karşılaştırıldığında, kanserli hücreler, anti-büyüme sinyallerine direnç, apoptozdan kaçınma, büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenezin desteklenmesi, doku ve metastaz istila etme yeteneği, değiştirilmiş metabolik yollar ve bağışıklık sisteminden kaçma yeteneği gibi bir dizi 'ayrıt edici özellik' sergilemektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda günümüzde ortaya çıkan

ayırt edici özelliklere ek olarak fenotipik plastisitenin kilidini açma, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyomlar ve yaşlanmış hücreler olarak tanımlanan ayırıcı özellikler eklenmiştir (Hanahan, 2022).



Şekil 6. Kanser Hallmak'ları (Hanahan, 2022).

Ağız kanseri oluşumu, bazıları Şekil 6'da de özetlenen, normal ağız mukozasının çeşitli fonksiyonlarını ve sinyal yollarını aktive eden veya inhibe eden bir dizi genetik ve epigenetik değişikliğin birikmesiyle oluşur. Genetik değişiklikler, çeşitli etiyolojik risk faktörleri veya genetik yatkınlık tarafından yönlendirilebilir. Alan defekti veya alan etkisi olarak da bilinen, 1953'te Slaughter ve arkadaşları tarafından tasarlanan “alan kanserizasyonu” kavramı, geniş bir doku alanının genetik olarak fakat histolojik olarak değişmediği ve malin transformasyona daha duyarlı olduğu süreci tanımlar (Slaughter, Southwick ve Smejkal, 1953). Ağız kanseri, diğer dokulardaki karsinomlar gibi, uzun yıllar içinde gelişir ve bu süre zarfında, ağız boşluğu boyunca meydana gelen birçok neoplastik dönüşüm bölgesi olabilir. Oral karsinogenez sürecinin çokluğu, tek başına premalin bir lezyonun cerrahi olarak çıkarılması yoluyla kansere ilerlemeyi durdurmayı zorlaştırır. Tümör baskılayıcı genlerin multifokal sunumu ve mutasyonel ekspresyonunun çeşitli çevresel ve eksojen faktörlere uzun süreli maruz kalmanın bir sonucu olabileceğini hatırlamak önemlidir (Tanaka ve Ishigamori, 2011).

Premalin lezyonlardaki hücrelerde meydana gelen genetik değişiklik (veya değişiklikler) ile seçici büyüme avantajının kazanılması nedeniyle klonal olarak genişler ve bu başlatılan hücreler, negatif büyüme düzenleyicilerine ve hücre farklılaşma indükleyicilerine daha az tepki verebilir. Başlatılan hücreler veya normal hücreler, ek veya çoklu genetik değişikliklerle malin hücrelere dönüşür ve birincil tümörler üretir (Mohan ve Jagannathan, 2014). Karsinomla uyumlu bir dizi doku ve hücresel değişiklik, genellikle OSCC'den önce gelir, ancak yüzey epitel tabakasıyla sınırlı kaldığında, oral epitel displazisi (OED) olarak adlandırılan potansiyel olarak malin bir durumdur (Dost, Do ve Farah, 2016; S. Warnakulasuriya ve diğerleri, 2007). OSCC gelişiminde lineer olmasa da, basit bir epitel hiperplazisi olarak başladığı ve OED boyunca ilerlediği, daha kapsamlı genetik sapmaları gösteren daha şiddetli displastik değişikliklerle birlikte genel bir fikir birliği vardır (Dost ve diğerleri, 2016).

2.5.2. Genetik Değişiklikler

Genetik değişiklikler karsinogenezin moleküler temelini tanımlar ve bunlar nokta mutasyonları, amplifikasyonları, yeniden düzenlemeleri, kopya sayısı varyasyonlarını, delesyon ve insersiyonları ve ayrıca tüm ekzomların veya genomların kromozomal yer değiştirmelerini içerir. Onkogenler, yüksek düzeyde düzenlenmiş normal hücresel karşılıkların (protoonkogenler) mutasyonları, muhtemelen oral neoplazinin başlaması ve ilerlemesinde rol oynar. Oral kanserlerde meydana gelen genetik hasar iki kategoriye ayrılabilir: protoonkogenlerde meydana gelen baskın değişiklikler ve bazı tümör baskılayıcı genlerde (TSG'ler) fonksiyon kaybı ve çekinik değişiklikler (Mohan ve Jagannathan, 2014). Tüm baş ve boyun kanseri hücrelerinin yaklaşık üçte ikisi, displastik ve karsinoma *in situ* lezyonlarında görülen, kromozom 9p21-22'de bulunan silinmiş bir bölge içerir, bu nedenle bu bölgedeki genin karsinogenezde erken devre dışı bırakıldığını düşündürür (Shpitzer ve diğerleri, 2009). 3p ve 13q'daki kromozomal bölgeler de sıklıkla silinir (Guo ve Califano, 2015). Protoonkogenlerin oral karsinogenez epidermal büyüme faktörü reseptörünün (*EGFR*, *c-erb1*), ras ailesinin üyeleri ve ayrıca *bel*, *c-myc*, *hst-1*, *PRAD-1*, *int-2* ve in anormal ekspresyonunun katkıda bulunduğu inanılmaktadır (Shpitzer ve diğerleri, 2009). *Glutasyon S-transferaz M1* (*GSTM1*) boş genotipi, baş ve boyun kanseri için en tutarlı polimorfik duyarlılık belirteci gibi görünmektedir (Aida ve diğerleri, 2010). *ALDH1B* ve *ALDH2* (aldehit dehidrojenaz 2) genleri de baş-boyun kanserleri ile ilişkilidir ve alkol tüketimi ile anlamlı korelasyon gösterir (Aida ve diğerleri,

2012). Tüm birincil baş-boyun kanserlerinin %50'sinden fazlası bir *p53* mutasyonu barındırır ve *p53*'ün etkisizleştirilmesi, tüm insan kanserlerinde en yaygın genetik değişikliği temsil eder. Normal hücre biyolojisinde, *p53*, DNA sentezinin düzenleyicisi olarak görev yapar ve genomik DNA hasar gördüğünde, G1-S sınırında hücre bölünmesini engellemek ve DNA onarımını uyarmak ve apoptoza yol açan yolları aktive etmek için *p53* üretilir (Guo ve Califano, 2015). *p53* mutasyonu, bir tümörün G1'den S fazına geçmesine ve diğer aktive onkogenlere veya inaktive edilmiş TSG'lere yol açan genetik değişiklikleri yaymasına izin verir (Guo ve Califano, 2015). Baş ve boyun kanserinde en sık silinen bölge kromozom 9p21-22'de bulunur (Nawroz ve diğerleri, 1994). Baş ve boyun kanserindeki invaziv tümörlerin çoğunda kromozom 9p21 kaybı meydana gelir ve bu bölgedeki sık görülen homozigot delesyonlar, tanımlanan en yaygın genetik değişikliklerden birini temsil eder (Nawroz ve diğerleri, 1994). Bu delesyona uğramış bölgede bulunan *p16* (CDKN2), siklin D1'in güçlü bir inhibitörüdür ve bu *p16* kaybı, aynı zamanda çoğu ilerlemiş premalin lezyonlarda bulunmuştur ve erken malin ilerlemede önemlidir (Woodford, Johnson, Costa ve Young, 2014). 17p kromozomunun kaybı da çoğu insan kanserinde siktir ve invaziv lezyonların yaklaşık %60'ında görülür (Modrich, 2006). *p53* inaktivasyonu, invaziv lezyonlarda 17p kaybı ile yakından ilişkili olsa da, 17p kaybı içeren erken lezyonlarda *p53* mutasyonları oldukça nadirdir (Modrich, 2006). Primer tümörlerde de kromozom kolu 10 ve 13q'nun kaybı kaydedilmiştir (Guo ve Califano, 2015). Tümör baskılayıcı *p53*'ün fonksiyon kaybı, kontrolsüz hücre bölünmesine ve heterozigosite kaybı (LOH) ve mikro uydu kararsızlığı (MSI) gibi ilerleyici genomik kararsızlığa neden olabilir.

Kromozom 3p14, tümör baskılayıcı gen *Frajil Histidin Triadın*'ın (*FHIT*) yanı sıra ortak bir frajil bölge olan *FRA3B*'yi içerir ve bu bölge erken tümör oluşumunda sıklıkla silinir ve silinmesi sigara dumanına maruz kalma ile ilişkilidir (Kujan ve diğerleri, 2006). *Transforming Growth Factor-α* (*TGF-α*), oral karsinogeneze erken dönemde hiperplastik epitel tarafından ve daha sonra inflamatuvar infiltrat, özellikle oral epitel çevreleyen eozinofiller tarafından ve daha sonra ikinci bir primer kanser geliştiren baş ve boyun kanseri hastalarında aşırı eksprese edilir ve normal oral mukoza *TGF-α*'yı aşırı salgılar, bu da epitelin hızlı proliferasyonunun ve genetik kararsızlığın premalin durumunu düşündürür (Jurel, Gupta, Singh, Singh ve Srivastava, 2014). *TGF-α* ve *EGFR*'nin birlikte ekspresyonu, tek başına *EGFR*'yi aşırı eksprese edenlerden daha agresif tümörleri gösterebilir (Jurel ve diğerleri, 2014). Oral keratinosit proliferasyonunu inhibe etmede

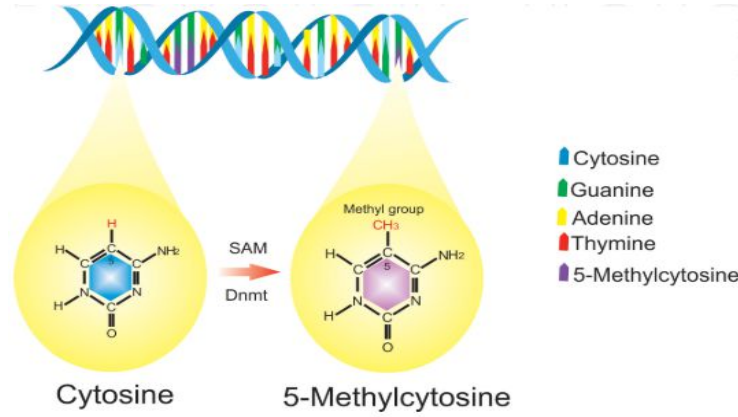
ayrıca önemli olan, oral kanserlerde aşağı regüle edilen hem bölünme hem de metastaz ile ilişkili bir hücreden hücreye yapışma molekülü olan E-cadherin ve ağız kanseri gelişimi sırasında mutasyona uğrayan önemli bir hücreden hücreye temas inhibitörü olduğuna inanılan benzeri bir molekül N-Cam gibi hücre yüzeyi molekülleridir. (Todd ve diğerleri, 1995). Hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemeye yardımcı olan transkripsiyon faktörü *c-myc*, ağız kanserinde sıklıkla aşırı eksprese edilir ve bu en sık olarak kötü farklılaşmış tümörler ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Shpitzer ve diğerleri, 2009). Ağız kanserinde de amplifiye olan diğer bir önemli transkripsiyon faktörü, hücre döngüsü promotörü *PRADI* (ayrıca *CCND1* veya *siklin D1*) oral karsinogenez için önemi araştırılmaktadır (Field, 1995). Büyüme baskılayıcı hücre içi haberciler, belirli ailesel kolorektal kanserlerde sıklıkla mutasyona uğrayan G-benzeri bir protein olan *adenomatöz polipozis koli (APC)* genini içerebilir ve *APC* geni premalin oral lezyonlarda değişebilir (Shpitzer ve diğerleri, 2009).

2.5.3. Epigenetik Modifikasyonlar

Epigenetik modifikasyonlar, DNA bazlarının dizilimindeki bir değişiklikten kaynaklanmayan, gen ifadesinde kalıtsal, geri dönüşümlü değişiklikler olarak tanımlanabilir (Momparler 2003; Teodoridis ve diğerleri 2004; Castilho ve diğerleri 2017). Bu nedenle epigenetik mekanizmalar, DNA dizilerine müdahale etmeden fenotipi değiştirir (Arantes ve ark. 2014). Epigenetik süreçler arasında DNA metilasyonu, histon transkripsiyon sonrası kovalent modifikasyonlar, kromatin yapısındaki değişiklikler ve kodlamayan RNA'ların etkileri yer alır (Arantes ve ark. 2014; Castilho ve ark. 2017). Bir epigenetik model, diyet, alkol, tütün, toksinler veya farmasötik tedavi gibi dış faktörler tarafından modüle edilebilir (Ghantous ve ark. 2018). Epigenetik mekanizmalar çok sayıda kanserin karsinogenezi ile ilişkilidir (Park ve ark. 2011; Osorio ve Castillo 2016) ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) gelişiminde önemli bir rol oynar.

2.5.3.1. DNA Metilasyonu

5'-CG-3' dizisindeki sitozinin 5 pozisyonundaki karbona bir metil grubunun (CH_3) kovalent olarak eklenmesi olan DNA metilasyonu, en yaygın epigenetik mekanizmalardan biridir (Şekil 10) (Gopisetty, Ramachandran ve Singal, 2006; Luczak ve Jagodziński, 2006; Magić, Supić, Branković-Magić ve Jovic, 2012; Momparler, 2003).



Şekil 7. DNA Metilasyonu. (Osorio ve Castillo, 2016)

Metilasyonun hedefleri, intergenik DNA, genler veya kodlamayan tekrarlayan diziler gibi herhangi bir DNA dizisinde olabilir (Reyngold ve Chan, 2013). Bununla birlikte, genomda CpG dinükleotidleri asimetrik olarak düzenlenmiştir; normal hücrelerde tekli CpG'ler yüksek oranda metillenirken, CG dinükleotitlerinin %60-70'ini içeren 0.5-4 kb DNA bölgeleri olan CpG adacıkları (CGI'ler) genellikle metillenmemiştir. Genlerin yaklaşık %50'si promotör bölgelerinde CGI'lar içerir (Luczak ve Jagodziński, 2006; Magić ve diğerleri, 2012; Reyngold ve Chan, 2013) ve metilasyon çoğunlukla promotör bölgede veya ilk ekson dizisinde meydana gelir (Arantes, De Carvalho, Melendez, Carvalho ve Goloni-Bertollo, 2014; Gopisetty ve diğerleri, 2006; Luczak ve Jagodziński, 2006). Metilasyon, DNMT1, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B'den oluşan DNA metiltransferaz ailesinin (DNMT'ler) üyeleri tarafından katalize edilir. DNMT1, replikasyon sırasında metilasyondan sorumlu bir bakım enzimidir, de novo metilasyon ise DNMT3A ve DNMT3B tarafından katalize edilir (Arantes ve diğerleri, 2014; Luczak ve Jagodziński, 2006). DNMT ailesi enzimleri, S-adenosilhomosisteine (SAH) dönüştürülen bir metil donörü olarak S-adenosilmetiyonin (SAM) kullanır (Luczak ve Jagodziński, 2006; Osorio ve Castillo, 2016).

Metilasyon, özellikle dişi bireylerde inaktive edilmiş X kromozomu üzerinde bulunan susturulmuş genlerde ve genomik baskılamada gen ekspresyonunu düzenlemek için önemli bir süreçtir (Arantes ve diğerleri, 2014; Luczak ve Jagodziński, 2006; Park, Claus, Weichenhan ve Plass, 2011; Reyngold ve Chan, 2013). Çeşitli kanserlerde anormal metilasyon modelleri rapor edilmiştir ve iki farklı metilasyon modeli mevcuttur. Birincisi genom çapında hipometilasyon, ikincisi ise genlerin promotör bölgesinde yer alan CGI'ların hipermetilasyonudur. Küresel hipometilasyon, kromozomal kararsızlık ve gen

aktivasyonu ile bağlantılıyken, promotör bölgelerdeki artan metilasyon, kanserin spesifik bir belirteci olarak kabul edilen tümör baskılayıcı genlerin (özellikle DNA onarımı, hücre döngüsü kontrolü, apoptoz, anjiyogenez, hücre-hücre etkileşimi ve metastaz ile ilgili olanlar) epigenetik susturulmasına neden olur ve sonuç olarak, ekspresyonlarını azaltır (Arantes ve diğerleri, 2014; Bakhtiar, Ali ve Barh, 2015; Fan, 2004; Gopisetty ve diğerleri, 2006; Jones ve Laird, 1999). Öte yandan, bölgesel promotör hipermetilasyonunun varlığına rağmen, HNC vakaların yaklaşık %67'sinde global genomik hipometilasyonu ortaya çıkarır ve global hipometilasyon derecesi (genom boyunca tekrarlayan dizilerin metilasyon seviyesi ile ölçülür) sigara içme öyküsü, alkol ile ilişkilidir (Richards ve diğerleri, 2009; Smith, Mydlarz, Mithani ve Califano, 2007).

2.5.3.1.1. Hipermetilasyon

CGI promotörlerinin hipermetilasyonu, etkilenen genin transkripsiyonel baskısı ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır ve başlangıçta kanserde anormal şekilde hipermetile olduğu gösterilen birçok promotör, bilinen tümör baskılayıcı genlere (TSG'ler) karşılık gelir. Bu nedenle, anormal CGI hipermetilasyonu, TSG'lerin susturulmasına neden olan bir epimutasyon olarak görülmüştür (Feinberg ve Tycko, 2004). *p16* geni (*CDKN2A*), sikline bağımlı kinazları ve hücre döngüsü ilerlemesini inhibe eden bilinen bir tümör baskılayıcı gendir (Magić ve diğerleri, 2012; Padhi ve diğerleri, 2017). Promotörünün hipermetilasyonu, HNSCC çalışmaları ve meta-analizlerinde yaygın bir bulgudur (Alsofyani ve diğerleri, 2017; Choudhury ve Ghosh, 2015; Don ve diğerleri, 2014; Dvojakovska ve diğerleri, 2018; Sanchez-Cespedes ve diğerleri, 2000; Sushma ve diğerleri, 2016; Veeramachaneni ve diğerleri, 2019). Bir kontrol grubuna kıyasla OSCC hastalarında promotörünün daha yüksek bir metilasyon seviyesi bildirmiştir ve hipermetilasyon, tümör örneklerinde bu genin daha düşük ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Allameh ve diğerleri, 2019). Altmış yedi vaka kontrol çalışmasını karşılaştıran bir meta-analiz, HNSCC'de *p16* promotör bölgesinin normal kontrollere göre daha yüksek metilasyonunu doğrular ve metilasyon seviyesinin kontrol grubundan premalin lezyonları olan hastalara ve ardından sırasıyla HNSCC hastalarına doğru kademeli olarak arttığını gösterir. Hipermetilasyon, erkek cinsiyetin yanı sıra LN metastazı ile ilişkiliydi. Metillenmiş *CDKN2A* bu nedenle baş ve boyun kanseri için tanı ve prognozda yararlı bir belirteç olabilir (Zhou ve diğerleri, 2018).

HNSCC'deki diğer bir hipermetile tümör baskılayıcı gen, *Akt* sinyalinin negatif olarak düzenleyen ve sonuç olarak hücre proliferasyonunu azaltan fosfataz ve tensin homologudur (*PTEN*). Birkaç çalışma, ağız kanserinde (Alyasiri ve ark. 2013; Sushma ve ark. 2016) (Alyasiri ve diğerleri, 2013; Sushma ve diğerleri, 2016) ve nazofarenks kanserinde (Jinbang Li ve diğerleri, 2014) *PTEN* promotöründe hipermetilasyon bildirmiştir. Ayrıca, OSCC'de, bu artan metilasyon, iyi farklılaşmış tümörler ve bir Hint popülasyonu arasında 50 yaşın altındaki yaş ile ilişkilidir; metilasyon ile cinsiyet arasında bir ilişki bulunmamıştır (Alyasiri ve diğerleri, 2013). NPC dokularında ve NPC hücre dizilerinde *PTEN* promotöründe artan metilasyon, *PTEN*'in aşağı regülasyonu (Jinbang Li ve diğerleri, 2014) ve OSCC'den türetilen hücre dizilerinde *PTEN* mRNA'nın daha düşük ekspresyonu ile bağlantılıdır (Kurasawa ve diğerleri, 2008).

Bir tümör baskılayıcı gen olan ölümle ilişkili protein kinaz (*DAPK*), baş ve boyun kanserinde de hipermetillenir (Choudhury ve Ghosh, 2015; Sanchez-Cespedes ve diğerleri, 2000) ve hipermetilasyon, LN metastazları ve evre III ile pozitif korelasyon gösterir. HNSCC IV (Sanchez-Cespedes ve diğerleri, 2000), ayrıca dil kanserinde *DAPK*'nin daha düşük ekspresyonu ile ters orantılıdır (Bhat ve diğerleri, 2017). On sekiz çalışmanın meta-analizi, *DAPK* promotörünün metilasyonunun HNSCC hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla dört kattan fazla olduğunu doğrularken (Cai, Xiao, Niu ve Zhong, 2017), başka bir meta-analiz, OSCC hastaları arasında *DAPK* promotör hipermetilasyonunu doğruladı (Don ve diğerleri, 2014) ve daha yüksek nazofaringeal karsinom riski olan bir ilişki (Zhang, Shen, Liu, Liu ve Shu, 2018). *DAPK* promotörü, aynı zamanda, eşleşen cerrahi sınırlara kıyasla OSCC örneklerinde daha yüksek oranda metillenmiştir ve ilginç bir şekilde, LN metastazı ve HNSCC hastalarının daha büyük yaşı ile ilişkilidir (Strzelczyk, Krakowczyk ve Owczarek, 2019).

MGMT geni (*O6-metilguanin-DNA metiltransferaz*) DNA onarımı ile ilgilidir ve promotöründe artan metilasyon HNSCC'de rapor edilmiştir (Chaisaingmongkol ve diğerleri, 2012; Dvojakovska ve diğerleri, 2018; Koutsimpelas ve diğerleri, 2012). 20 çalışmaya dayanan bir meta-analizde, *MGMT*'nin promotörü, sağlıklı kontrollere kıyasla HNSCC'de hipermetile edildi ve bu, daha yüksek metilasyon ile artan baş ve boyun kanseri riski arasında bir bağlantı olduğunu düşündürdü (Cai, Xiao, Niu, Shi ve Zhong, 2016). OSCC vakalarının meta-analizi de bu promotörde daha yüksek metilasyonu doğruladı (Don ve diğerleri, 2014) ve ayrıca artan metilasyon, daha düşük bir *MGMT* protein

seviyesi ile bağlantılıydı (Koutsimpelas ve diğerleri, 2012). Önerci Celebi ve ark., 2016, metilasyon seviyesini ölçmek için bir piro-sıralama tekniği kullandı ve *MGMT* promotörünün hipermetilasyonunun gırtlak kanserinde sık olduğunu gösterdi; bununla birlikte, hastaların yaş, tümör evresi veya farklılaşması ve hastalıklı sağkalım gibi klinikopatolojik özellikleri ile ilişkisi yoktur. Ayrıca HNSCC tümörlerinde cerrahi sınırlara göre hipermetilasyon saptanmıştır (Strzelczyk, Krakowczyk ve Owczarek, 2018).

E-cadherin (*CDH1*, *ECAD*), hücre adezyonu ile ilgili başka bir tümör baskılayıcı gendir ve HNSCC vakalarında sıklıkla hipermetillenir (Choudhury ve Ghosh, 2015; Strzelczyk ve diğerleri, 2018). 13 çalışmaya dayanan bir meta-analiz, *CDH1* promotörünün artan metilasyonunun ağız kanseri riski ile ilişkili olduğunu ortaya koydu (G. Wen, Wang ve Zhong, 2018) ve bu hipermetilasyonun, insanlarda E-kadherin proteininin daha düşük ekspresyonu ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. OSCC hastaları (Pannone ve diğerleri, 2014). Buna karşılık, Domingos ve ark., 2017, potansiyel olarak malin oral lezyonları olan hasta grupları, OSCC ve sağlıklı kontroller arasında *CDH1* promotörünün metilasyon seviyesinde hiçbir farklılık göstermedi; dahası, çoğu numunede *CDH1* gen promotörü metillenmemiştir ve OSCC grubunda metilasyon seviyesi klinikopatolojik özellikler ile ilişkilendirilmemiştir.

RASSF1 (*Ras ilişkili alanı içeren protein 1*) hücre döngüsü kontrolü, apoptoz ve hücrel adhezyonda önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gendir ve inaktivasyonu birçok kanserin gelişimi ile ilişkilidir (Donninger, Vos ve Clark, 2007). Baş ve boyun kanserinde, *RASSF1* promotörünün hipermetilasyonu sık görülen bir olaydır ve meta-analiz, bu kanserlerle önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermektedir (Choudhury ve Ghosh, 2015). *RASSF1A*'nın anormal metilasyonunun HNSCC için yararlı bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Meng ve diğerleri, 2016). Ayrıca, OSCC'nin yakın tarihli bir meta-analizi, *RASSF1A*'nın promotör hipermetilasyonunun ağız kanseri riski ile bağlantılı olduğunu doğrulamıştır ancak Koutsimpelas ve ark. Tarafından incelenen tümör örneklerinin sadece %13'ünde *RASSF1A*'nın hipermetilasyonunu gözlemledi (Koutsimpelas ve diğerleri, 2012; G. Wen ve diğerleri, 2018).

2.5.3.1.2. Hipometilasyon

Tekrar dizilerinde, transpozonlarda, gen çöllerinde veya intronlarda bulunan CpG dinükleotidlerinde global DNA hipometilasyonu genom kararsızlığını etkileyebilir (Ehrlich, 2009a; Hatziapostolou ve Iliopoulos, 2011). Öte yandan onkogenlerin veya latent

virüslerin aktivasyonunu uyarabilir (Castilho, Squarize ve Almeida, 2017; Magić ve diğerleri, 2012). HNSCC çalışmalarında genlerin veya retrotranspozonların promotörlerinin hipometilasyonu belgelenmiştir. Uzun serpiştirilmiş elementler (LINE'lar) veya kısa serpiştirilmiş elementler (SINE'ler) gibi retrotranspozon elementlerinde daha düşük metilasyon, genom destabilizasyonu yoluyla karsinogenezi etkiler. Normal memeli hücrelerinde LINE dizileri yüksek bir metilasyon statüsüne sahipken, kanser gelişimi sırasında hipometillenirler, bu da genom kararsızlığını etkileyen dizilerin transkripsiyonunun aktivasyonuna katkıda bulunur ve sonuç olarak karsinogenezi kolaylaştırabilir (Luczak ve Jagodziński, 2006; Reyngold ve Chan, 2013). LINE-1 (uzun serpiştirilmiş nükleotid-element1), normal hücrelere kıyasla çeşitli kanser hücrelerinde metilasyonu azaltmıştır ve meta-analiz, bu hipometilasyonun ileri kanser ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Kitkumthorn ve Mutirangura, 2011). Ek olarak, çeşitli kanserler için prognostik belirteçler olarak LINE, Alu ve Sat- α gibi tekrarlanan dizilerin metilasyonu ile ilgili 20 çalışmaya dayanan başka bir meta-analiz, global DNA hipometilasyon seviyesinin kasvetli bir prognozla bağlantılı olduğunu öne sürmektedir (Jinhui Li ve diğerleri, 2014). Birkaç çalışma, baş ve boyun kanserinde LINE'ların veya SINE'lerin hipometilasyonunu göstermektedir (Chaisaingmongkol ve diğerleri, 2012; Richards ve diğerleri, 2009; Subbalekha ve diğerleri, 2009). SINE'lerden biri olan Alu'nun hipometilasyonu Puttipanyalears ve ark., 2013 Asya popülasyonunda ağız kanserinde Alu metilasyonunun kanserin ileri evreleri ile azaldığını bildirmiştir. Foy ve ark., 2015 premalin oral lezyonları olan hastalarda LINE sekanslarının hipometile olduğunu ve oral karsinogenez riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, LINE-1 dizileri oral skuamöz hücreli karsinomda (OSCC), ancak tümörün klinik evresinden ve konumundan bağımsız olarak (Subbalekha ve diğerleri, 2009) ve ayrıca orofaringeal skuamöz hücreli karsinomda (OPSCC) hipometillenir (Furlan ve diğerleri, 2017). İlginç bir şekilde, LINE-1 hipometilasyonu olan OPSCC hastaları, daha yüksek metilasyonu olan vakalara kıyasla 3,5 kat daha yüksek erken relaps riskine sahiptir (Furlan ve diğerleri, 2017). Öte yandan, Smith ve ark., 2007 incelenen HNSCC vakalarının %67'sinde LINE-1 hipometilasyonunun meydana geldiğini ve bu korelasyonun çok değişkenli analiz ile anlamlı olmamasına rağmen, ANOVA kullanarak global hipometilasyonun tümörün ileri evresi ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Arayataweegool ve ark., 2019 PBMC'lerde LINE-1'in metilasyon seviyesini ölçmek için HNSCC hücre hatları ve periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC'ler) ortak kültürlerini kullandı ve bu seviyenin, HNSCC'ler tarafından salgılanan

faktörler nedeniyle kanser hücreleri ile birlikte kültürde önemli ölçüde aşağı regüle olduğunu buldu. HNSCC teşhisi için kullanılabilecek etki. Kitkumthorn ve ark., 2012 HNSCC hastalarının lenf nodu (LN) metastazlarında LINE-1 ve Alu sekanslarının metilasyon seviyesini ölçmüş ve metastazlı HNSCC örneklerinde daha düşük metilasyonlarını doğrulamıştır; bununla birlikte, sadece LINE-1'in hipometilasyonu istatistiksel olarak anlamlıydı ve ayrıca metilasyon seviyelerindeki düşüşler, tümörlerin evresi ve derecesi ile ilişkili değildi. Global hipometilasyonun dil skuamöz hücreli karsinomlu (TSCC) hastalar için karakteristik olduğu ve ilginç bir şekilde kadın cinsiyeti ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca H. C. Chen ve ark., 2016, lenf nodu tutulumu olmayan ve postoperatif radyoterapi uygulanan evre I veya II AJCC (Amerikan Ortak Kanser Komitesi) kanseri olan, ağırlıklı olarak kadın, yaşlı hastalarda olmak üzere TSCC hastalarında azalmış metilasyon ile kötü sağkalım arasında ilişkiler gözlemledi. Öte yandan Morandi ve ark., 2017, OSCC'de hiçbir hipometilasyon belirtisi gözlemlenmedi.

2.5.4. Oral Tümörlerde Biyobelirteçler

Histopatoloji, malin ilerleme riski açısından OPML'leri belirlemek ve izlemek için şu anda altın standarttır; bununla birlikte, bu tekniğin invazivliği ve değişkenliği göz önüne alındığında, ilerleyici OPML'yi ilerleyici olmayan OPML'yi ayırabilen biyobelirteçlerin tanımlanması daha da önem kazanmıştır. Bir biyobelirteç, “normal biyolojik süreçlerin, patojenik süreçlerin veya terapötik bir müdahaleye verilen farmakolojik tepkilerin bir göstergesi olarak objektif olarak ölçülen ve değerlendirilen bir özellik” olarak tanımlanabilir (Atkinson et al., 2001). Biyobelirteçler prognostik (prognoz bilgisi ve nüks potansiyeli), tanısal (tespit) veya öngörücü (tedaviye yanıtı öngören) olabilir.

Karsinogenez ve malin transformasyonun temelinde genomik instabilite yatmaktadır ve genomik bütünlüğün değerlendirilmesi malin transformasyonun bir biyolojik belirteci olarak kullanılmıştır. DNA içeriği/ploidi, kopya sayısı varyasyonu ve heterozigotluk kaybındaki değişikliklerin tümü, karsinogenez süreci boyunca meydana gelen genomik kararsızlığın belirtileridir ve bunların belirli kalıpları, malin transformasyonu tanımlamak için kullanılabilir (Hanahan & Weinberg, 2011). DNA içeriği/ploidi, genomik hasarın vekil bir belirteci olarak kullanılabilir ve akış veya görüntü sitolojisi ile ölçülür. Tütün içimi normal oral mukozada anöploidi indükler ve lökoplaki ploidideki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Bremmer et al., 2011; Souto et al., 2010). Kopya sayısı varyasyonu, genom boyunca anormal çoğaltma veya eklemeleri tanımlar ve

genomik kararsızlığın bir ölçüsüdür. -8p/+3q/+8q'lik karakteristik kopya sayısı varyasyonları ağız kanserinde tanımlanmıştır, ancak oral epitel displazisinde de mevcuttur, bu da bunların malin dönüşümde erken bir adım olabileceğini düşündürür. Sigara içenlerde HNSCC, özellikle 3q26/28 ve 11q13/22 amplifikasyonlarında kopya numarası değişikliklerinin yüksek prevalansını gösterir (Lawrence et al., 2015).

Heterozigotluk kaybı (LOH), somatik bir hücrede, bir genin sadece bir kopyasının kalması için heterozigot bir bölgede genomik materyalin kaybını tanımlar. Mutasyonların sık olduğu kanser durumunda, bu, örneğin, inaktive edici mutasyona karşı savunmasız bir tümör baskılayıcı genin kalan kopyasını bırakabilir.

Malin transformasyon LOH 3p ve 9p (8p, 11q, 13q ve 17p'nin yanı sıra) ile ilişkilendirilmiştir ve invaziv karsinoma geçiş LOH (6p, 8p, 4q 26–28, 10q23) ile ilişkilendirilmiştir. 3p ve 9q'da LOH'li lökoplaki, malin transformasyonda 3.8 kat artış gösterir ve bu, lökoplakinin yaklaşık %50'sinde mevcuttur (Van Der Riet et al., 1994).

Protein kodlama dizilerindeki değişiklikler, kanserdeki karmaşıklığın sadece bir kısmını kapsar. mikroRNA'da (miRNA), uzun kodlamayan RNA'da (lncRNA), kısa nükleolar RNA'da (snoRNA) ve epigenetik modifikasyonda kansere bağlı değişikliklerin, oral karsinogenez ve malin transformasyonu etkilediği gösterilmiştir (Johnson et al., 2016). miRNA'lar, protein kodlayan genlerin %30-60'ının ekspresyonunu düzenleyen ve aynı zamanda epigenetik yeniden şekillenmeyi etkileyebilen 21-23 nükleotid uzunluğundaki kısa kodlayıcı olmayan RNA'lardır (Malumbres, 2013). miRNA'ların, tümör baskılayıcı veya onkogenik proteinlerin ekspresyonunu etkileyerek onkogenler (örneğin miR21) veya tümör baskılayıcı genler olarak hareket ettiği gösterilmiştir.

miR21, miR181b ve miR345'in malin transformasyonun pozitif belirteçleri olduğu bulunmuştur (Cervigne et al., 2009). miR21, bir dizi kanser türünde mevcut olan ve dil kanserinde kötü hasta prognozu ile bağlantılı olduğu bilinen bir onkogenik miRNA'dır (Jung et al., 2012). miR31'in tükürük düzeylerinin yakın zamanda OPML'lerin ilerlemesi için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (Hung et al., 2016).

lncRNA'lar, uzunluğu 200'den fazla nükleotit olan kodlamayan RNA'lardır. miRNA'ları susturdıkları ve proteinlerin ekspresyonunu ve hücrel lokalizasyonunu modüle ettikleri bilinmektedir (Ebert & Sharp, 2010; Wiklund et al., 2011). Çeşitli lncRNA'lar kanserle ilişkilendirilmiştir. OSCC'de yapılan bir çalışma, lncRNA HOTAIR'ın normal doku ile karşılaştırıldığında yukarı regüle edildiğini (metastaz) ve *GAS5*'in

(büyüme durmasına özgü transkript 5) ve *MEG-3*'ün (anne tarafından eksprese edilen gen 3, tümör baskılayıcı) down regüle edildiğini bulmuştur (Zou et al., 2015). Bu çalışma ayrıca OSCC'de aşağı regüle edilmiş iki yeni tümör baskılayıcı lncRNA'yı tanımladı—lnc-LCE5A-1 ve lnc-KCTD6-3. Bunlar, HNSCC hücre dizilerinde aşırı eksprese edildiğinde kök hücreler ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili gen ekspresyonunun yanı sıra çoğalmayı ve göçü azaltabildi (Farah et al., 2019).

2.6. NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B3 (*NDUFB3*)

NDUFB3 geni 2. kromozomun uzun (q) kolunun 33.1 bandına lokalize, 98 aminoasitten oluşan, 11402 Da'lık bir moleküldür. *NDUFB3* mitokondrilerin elektron taşıma zincirindeki ilk enzim olan mitokondriyal membran solunum zinciri NADH dehidrojenazın (Kompleks I) bir aksesuar alt birimini kodlamaktadır. Kompleks I (NADH:Ubikinon oksidoredüktaz veya NADH dehidrojenaz), protonları mitokondriyal matrinden pompalamak için glikolizden ve TCA döngüsünden oluşan NADH'yi kullanır. 45 alt birim içeren elektron taşıma zincirindeki en büyük enzim kompleksidir. Yedi alt birim mitokondriyal DNA tarafından kodlanır, geri kalanı çekirdekte kodlanır. Bu protein, tek geçişli membran proteini olarak mitokondrinin iç zarında lokalize olmaktadır (National Center for Biotechnology Information, 2022).

NDUFB3 geninde meydana gelen mutasyonlar, kompleks I eksikliğine ve ölümcül infantil mitokondriyal hastalığa neden olur (Calvo ve diğerleri, 2012). Tekrarlayan bir homozigot *NDUFB3* mutasyonu (c.64T>C, p.Trp22Arg), mitokondriyal disfonksiyonu, kısa boy ve belirgin bir alın, pürüzsüz filtrum ve derin yerleşimli gözler dahil olmak üzere ayırt edici fiziksel görünüm ile ilişkilendirilmiştir (Alston ve diğerleri, 2016).

Yapılan çalışmalarda *NDUFB3* homozigot patojenik varyantı, mitokondriyal bozukluğu olan ve önceden alkolsüz steatohepatit tanısı almış bir hastada da tespit edilmiştir (Hakim ve diğerleri, 2019).

NDUFB3, RPL hastalarından alınan desidual hücrelerde *NDUFB3* önemli ölçüde arttığından ve *NDUFB3*'ün aşırı ekspresyonu mitokondriyal membran potansiyelini azalttığından ve hücre canlılığını ve oksidatif stresi inhibe ettiğinden, tekrarlayan gebelik kaybının (RPL) patolojik sürecini teşvik etmede önemli bir rol oynamaktadır (Yin, Hong, Tian ve Li, 2021).

Ek olarak, yüksek yağlı diyetle (HFD) beslenen sağlıklı genç erkeklerde ve HFD'li farelerde yapılan araştırmada *NDUFB3* mRNA'sında azalma tespit edilmiştir (Sparks ve diğerleri, 2005).

Nazofaringeal karsinom hücrelerinde *NDUFB3*'ün in vitro yıkımı, cisplatin kaynaklı mitoROS üretiminde önemli düşüşler sergileyerek mitoROS üretimi ile pozitif korelasyon göstermektedir (Chung ve diğerleri, 2020).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 2020/639 dosya numarası ile onayı alınmış çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Gülsüm Ak tarafından OPML tanısı almış 30 hastadan ve İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Murat Uluşan tarafından OSCC tanısı almış 30 hastadan alınan tümör, eşlenik-normal doku ve serum-tükürük gibi vücut sıvıları ile sağlıklı kontrol olarak kendisinde, ailesinde malin veya benin hikayesi uvulopalatofaringoplasti (UPPP) ya da implant tedavi işlemi operasyonları uygulanmış 15 sağlıklı kişiden, çalışmanın detaylı bilgileri aktarıldıktan sonra rızaları ve imzaları alınmasının ardından doku (aynı bireye ait normal doku) ve vücut sıvı (aynı bireye ait serum ve tükürük) örnekleri hem ekspresyon hem de metilasyon deneylerinde kullanılmak üzere toplanmıştır.

Serum, tükürük, doku ve kan örnekleri santrifüj edilerek elde edilen serum içeriği laboratuvarımız içerisinde bulunan -80 derecede çalışan buzdolaplarında dondurularak saklandı.

3.1.1. Tez Çalışması İçin Gerekli Olan Ekipmanlar

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli olan cihazlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Tez Deneyleri İçin Gerekli Olan Ekipmanlar

- -80 Dereceli Derin Dondurucu (Sanyo, Japonya)	-Jel Yürütme Sistemi (Vilber-Lourmat, Almanya)
-Agaroz-Jel Elektroforez Tank (BRL Life Technologies, ABD)	-LightCycler480 Real Time (ROCHE, Almanya)
-El homojenizatörü (Qiagen,Almanya)	-Mikropipetler (Thermo, İsveç)
-Etüv (Hereaus, Almanya)	-Vorteks (Snijders, Hollanda)
-Soğutmalı Santrifüj (Hettich Mikro 200R, Almanya)	-Güç Kaynağı
-Hassas Ölçüm Cihazı (Chyo, Japonya)	-Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)

3.1.2. Tez Çalışması İçin Gerekli Olan Kimyasal Maddeler

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli olan kimyasal maddeler Tablo-3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

-Agaroz (Wisent MultiCell-Kanada)	-Borik/asit (Wisent MultiCell-Kanada)
-Etilen diamin tetraasetikasit (Sigma-Almanya)	-OrangeG (Merck-Almanya)
-Etidyum-Bromür (Sigma-Almanya)	-Deoksi-ribonükleotid-trifosfat (Fermentas-Litvanya)
-Taq-Polimeraz (Thermo Scientific-Almanya)	-Ethanol Alkol (Riedel De Haen-Almanya)
-İso-propanol (Riedel De Haen-Almanya)	-SssI-Metil-az Enzim (New England Biolabs-ABD)
-Magnezyum Klorür (Thermo-Litvanya)	-Sodyum-Dodesil-Sülfat (Merck, Almanya)
-Proteinaz/K (Roche-Almanya)	-Trishel (Applichem-Almanya).
-Ribonükleaz/A (Sigma-ABD)	

3.1.3. Tez Çalışması İçin Kullanılan Kimyasal Solüsyon ve İçerikleri

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli olan kimyasal karışımlar ve içerikleri Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Kimyasal Solüsyonlar ve İçerikleri

Kimyasallar	İçeriği
Parçalama Tamponu	➤ 155 mM NH ₄ Cl ➤ 10 mM KHCO ₃ ➤ 75 milimolar NaCl ➤ 25 mM EDTA ➤ 20 milimolar Tris-HCl (pH: 8.0)
SE Tamponu	➤ 0,1 mM ED-TA (pH= 8,0)
TE Tamponu	➤ 30 mM TrisHCl (pH= 8.0)
Fenol için TE Tamponu (0,5 ml)	➤ 1 mM ED-TA (pH= 8.0)
FenolKloroformİsopropanol (1:1)	➤ 0, 5 mM ED-TA (pH= 8.0)
Proteinaz-K	➤ 1 (FenolKloroform) 1 İso-propanol alkol
Ribonükleaz-A	➤ 20 mg/ml
%10 oranında SDS (pH=7,2)	➤ 10 mg/ml
	➤ 100 g sodyum-dodesil-sülfat

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Gerekli Materyellerin Toplanması

3.2.1.1. Dokuların Toplanması

İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları/Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene

Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından OSCC ve OPML tanılı 30'ar hastanın ait 0,5 cm çapında tümör ile eşlenik/normal dokusu ve malin bir sebebi olmayan nedenle cerrahi operasyon uygulaması yapılan 15 bireyden uvulopalatofaringoplasti tekniği ile 0,5 cm çapında sağlıklı doku elde edildikten sonra soğuk zincirle laboratuvara alındı ve Nükleik asit izolasyon işlemlerine kadar -80 buzdolaplarında saklandı.

3.2.1.2. Serum Örneklerinin Elde Edilmesi

Ameliyat yapılmadan önce, hasta ve sağlıklı kişilerden alınan 8-10 mL hacminde periferik kan örnekleri serum ayırma tüplerine (kuru tüp) toplandı. Daha sonra laboratuvar götürüldükten sonra 1950 rpm'de 30 dakika süresince santrifüje bırakılıp, tüpün üstünde kalan sarı fazın (serum) 1 mL olacak şekilde kriyotüplere dağıtılması ile yapılmıştır.

3.2.1.3. Tükürük Örneklerinin Elde Edilmesi

Hasta ve sağlıklı bireylerden ameliyat öncesi toplanan tükürük örnekleri 15 ml falcon içinde toplanmalıdır. Çalışma için örnekleri toplanacak bireylerden, ameliyatlarından 1 saat öncesine kadar sıvı yada katı herhangi bir besin almamaları ve diş fırçalamaları gibi kişisel ağız hijyenlerine dikkat etmeleri hususunda hekimleri tarafından bilgisi verildi. Çalışmaya katılma rızası gösteren gönüllüleri toplama işlemi de yine ilgili hekimin denetiminde bir prosedür verilerek gerçekleştirilmiştir. Bu prosedür 3 adımdan oluşmaktadır. Bu adımlar;

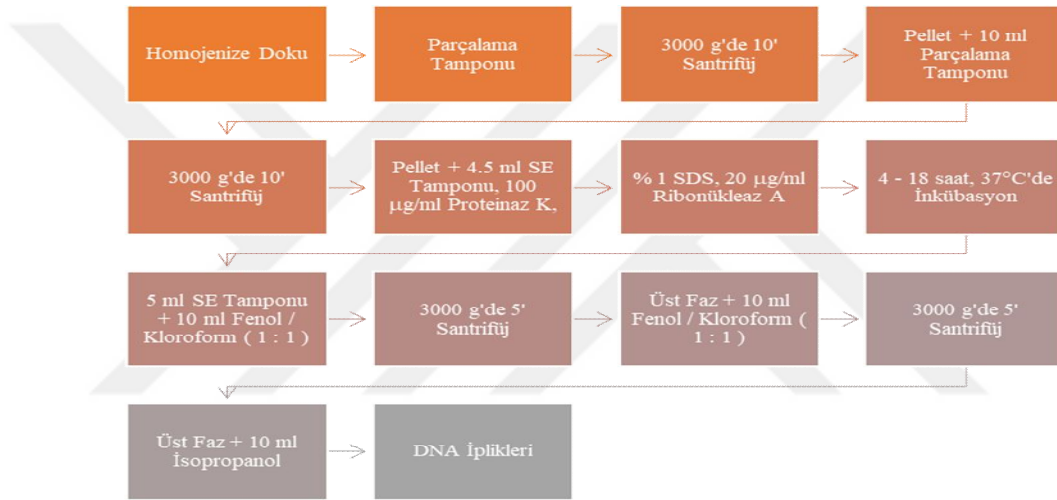
- 1.adım: Ağız 60 saniye boyunca temiz içme suyu ile çalkalanmalıdır.
- 2.adım: Ardında 5 dk boyunca ağız içinde biriktirilen tükürük hekim tarafında kendisine verilen kap içerisinde biriktirilir.
- 3.adım: 2. adım 30 dakika boyunca 15 ml hacminde tükürük toplanana kadar tekrarlanır. Tükürük kabı etiketlenmelidir. Tükürükler +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Nükleik Asitlerin İzolasyonu

Toplanıp -80°C'de saklanan doku örnekleri, periferik kan ve tükürük örneklerinden santrifüj işleminde sonra elde edilen serum örnekleri DNA ve RNA izolasyonları için kullanıldı.

3.2.2.1. Dokudan DNA'ların Eldesi

Hasta bireylerin tümör, eşlenik/normal doku tükürük ve serum örnekleriyle sağlıklı bireylerin normal mukoza, tükürük ve serum örneklerinden DNA eldesi yapılacaktır. Dokular el homojenizatörü ile homojenize edilecektir. İzolasyon basamakları Şekil 8’de gösterilmiştir. İzolasyon işleminden sonra DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerleri oranlanarak belirlenecektir. Metilasyon deneylerinde kullanılmak üzere gerçekleştirilecek bisülfid modifikasyon işlemine kadar -20°C’de saklanmıştır.



Şekil 8. Dokudan DNA İzolasyon Basamakları.

3.2.2.2. Serumdan DNA’ların İzolasyonu

Serum örneklerinin DNA izolasyon işlemi QIAamp DNA Blood MiniKit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi ve bu adımlar Şekil 9’da gösterilmiştir. Sonrasında elde edilen örnekler -20°C’de muhafaza edildi.



Şekil 9. Serumdan DNA İzolasyonu Basamakları

3.2.3. RNA İzolasyonu

3.2.3.1. Dokudan Total RNA Eldesi

Doku örneklerinin Total RNA izolasyonu “Norgen Total RNA Purification Kit” (Norgen, Kanada) ile Şekil 10’da gösterilen adımlar takip edilerek yapılacaktır. Elde edilen total RNA örnekleri Nanodrop 2000c (Thermofisher, ABD) ile spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra cRNA dönüşümüne kadar -80°C’ de saklanacaktır.



Şekil 10. Dokudan Total RNA İzolasyonu.

3.2.4. cDNA Dönüşümü

Total RNA örneklerinden cDNA dönüşümü için Transcriptor cDNA Synth. kit kullanılacaktır. Tüm örneklerin cDNA dönüşümleri tamamlanacaktır. 2 µl DNA örneği 1 µl oligodT primer ile 65°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra aynı tüp içerisine 1,5 µl birinci zincir cDNA mix’i, 0,25 µl DTT ve 0,25 µl reverse transkriptaz eklenecektir. 50°C’de 30 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra 4,5 µl ikinci zincir cDNA miksi, 0,5 µl ikinci zincir DNA polimeraz eklenerek 65°C’de 10 dakika ve 80°C’de 3 dakika inkübasyon yapılacaktır. Her tüpe 2 µl transkripsiyon tamponu, 10 µl NTP premiks, 3 µl UTP/Biotin UTP, 3µl DTT ve 2 µl DNA polimeraz eklendikten sonra 42°C’de 4 saat inkübasyon yapılacaktır. Son olarak 2 µl DNaz enzimi eklenecek ve 37°C’de 15 dakika inkübasyon ile cDNA elde edilecektir. Elde edilen cDNA örnekleri Nanodrop 2000c (Thermofisher, ABD) ile spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra ekspresyon array çalışmasına kadar -80°C’ de saklanacaktır.

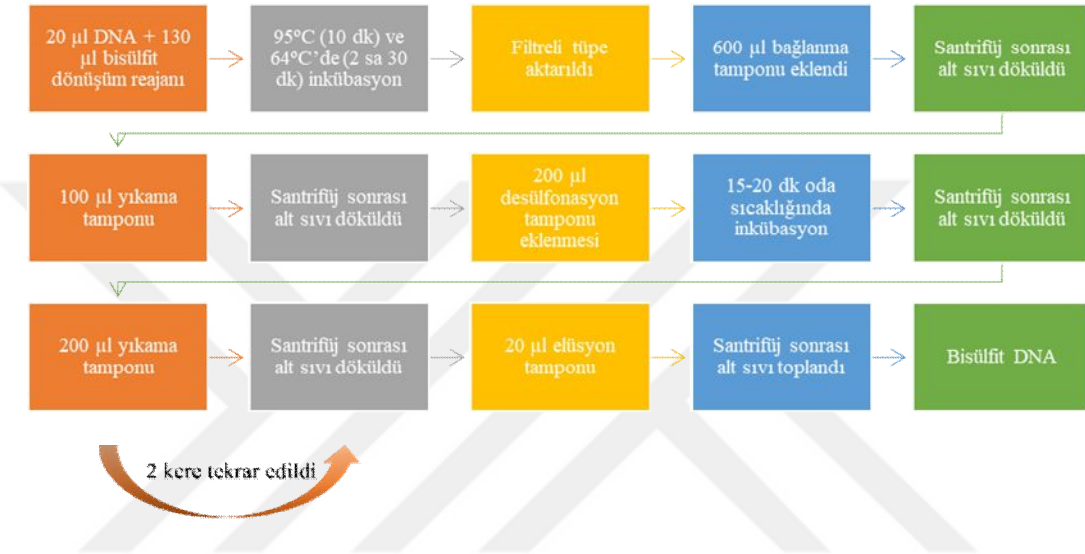
Tablo 5. cDNA Dönüşümünde Kullanılan Solüsyonlar ve PCR Koşulları

Solüsyonlar		Hacim
Total RNA (1 µg’ye kadar)		n µl
5x Trans Amp Buffer		4 µl
Reverse-Transkriptaz		1 µl
dH ₂ O		Total hacim 20 µl’ye tamamlanacağı kadar
PCR Aşaması		Zaman
Primer Bağlanma	25 °C	10 dk
Reverse Transkripsiyon	42 °C	15 dk
	48 °C	15 dk
İnaktivasyon	85 °C	5 dk
Soğuma	4 °C	-

3.2.5. Bisülfıt Dönüşümü

Çalışmaya katılan bireylerin tümör, normal doku ile vücut sıvılarından elde edilen genomik DNA örneklerinin bisülfıt modifikasyon aşamaları optimizasyonu yapılarak en verimli ve ekonomik sonucu aldığımız “Zymo Methylation Gold Kit” (Zymo, CA, ABD) ile gerçekleştirilecektir. 20 µl hacmindeki DNA, farklı bir tüpe aktararak 130 µl bisülfıt modifikasyon solüsyonu eklenecektir. PCR’da 95°C (yarım dakika) ve 50°C’de (60 dakika, 16 tekrar) inkübesi yapılacak ve 600 µl hacminde bağlanma tamponu eklenecektir. Filtresi bulunan kolon tüplere işlenen örnekler transfer edilecek ve santrifüj ile DNA’ların kolonlara tutunması sağlanacaktır. Santrifüj, 100 µl wash tamponuyla birlikte yıkanarak

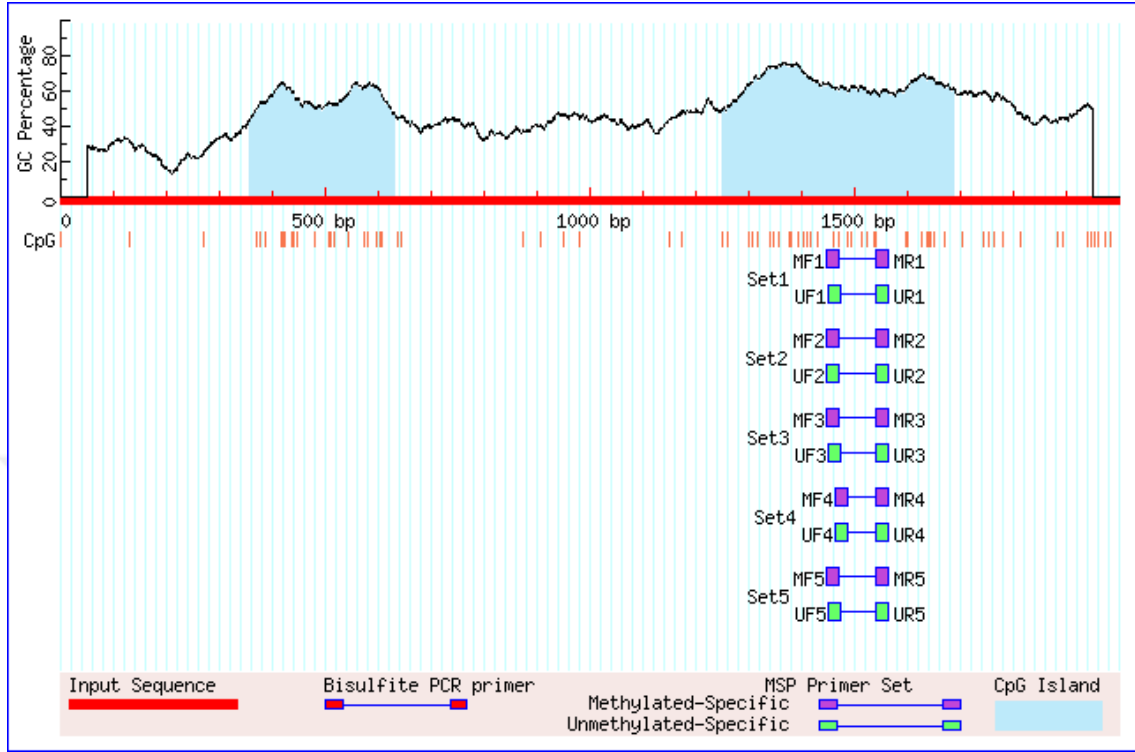
yapılacaktır. 200 µl hacminde desülfonasyon tamponu eklenerek ve santrifüj sonrasında 200 µl hacminde wash tamponu ile tekrar aynı işlem gerçekleştirilecektir. Son aşamada 10 µl hacminde elüsyon tamponuyla bisülfite dönüşüm adımları başarıyla sonlanacaktır. İşlemi tamamlanan bisülfite dönüşmüş bcDNA'lar metilasyon çalışmaları başlayana kadar -20°C' de saklanacaktır.



Şekil 11. Bisülfite Dönüşümü Basamakları.

3.2.6. Ekspresyon ve Metilasyon Deneyleri İçin Primer ve Prob Tasarlanması

Çalışmamızda tüm genom ekspresyon ve metilasyon array analizi sonucunda belirlenip metilasyon ve buna bağlı ekspresyon profilleri incelenecek olan *NDUFB3* geninin primerlerinin ve metilasyon deneyleri için kullanılan problemlerin tasarımları sırasıyla internette erişime açık olan Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) ve Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) programları ile primer ve prob tasarımı kurallarına uyularak tarafımızdan tasarlanmıştır.



Şekil 12. *NDUF3* geninin promotör bölgesindeki CpG adacıkları.

Tablo 6. *NDUF3* geninin Ekspresyon ve Metilasyon Deneylerinde Kullanılan primer ve prob dizileri.

<i>NDUF3</i> EF	5' TGGTGGTTGAGCCTGAGAAG '3
<i>NDUF3</i> ER	5' ACAGCGACAGCGATGAGAAG '3
<i>NDUF3</i> MF	5' TGGTTTACGAGAGGTTTCGG '3
<i>NDUF3</i> MR	5' CACACAAAACGAAACTACCGA '3
<i>NDUF3</i> Prob	5' TCGTTTGTAGTTTTCGCGGTCGAA '3

Tez çalışmamızda ekspresyon deneylerinde referans gen olarak *ACTB* geni kullanılmıştır. *ACTB* ekspresyon primerleri Demokan S ve ark. tarafından yapılmış olan çalışmadan alınmıştır (Demokan et al., 2013). *ACTB* geninin metilasyon deneylerinde kullanılacak primer ve prob dizileri ise Carvalho ve ark. tarafından yapılan çalışmadan alınmıştır (Carvalho et al., 2008).

Tablo 7. *ACTB* geninin Ekspresyon ve Metilasyon Deneylerinde Kullanılan primer ve prob dizileri.

<i>ACTB</i> ER	5'GTCTCCCCTCCATCGTG'3
<i>ACTB</i> EF	5'AGGGTGAGGATGCCTCTCTT'3
<i>ACTB</i> MF	5'TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT'3
<i>ACTB</i> MR	5'AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA'3
<i>ACTB</i> PROB	5'ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA'3

3.2.7. QMSP (Metilasyona Spesifik Olan Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Metilasyon Analizi

OSCC ve OPML hasta gruplarına ait tümör, eşlenik-normal doku ve vücut sıvısı örnekleri ile sağlıklı bireylere ait normal doku, tükürük ve serum örneklerinde *NDUFB3* genindeki hipometilasyon varlığının incelenmesi planlanmaktadır. Sodyum bisülfid ile kimyasal modifikasyon sonrası, yapılacak olan PCR, primer için 600 nM; 200 nM floresan işaretli prob; 0,6 U platinum Taq polimeraz; 200 µM dNTP karışımı (dATP, dCTP, dGTP and dTTP); 1X Rox Dye referans boya ve 1X Buffer (16,6 mM amonyum sulfat; 67 mM Tris; 6,7 mM magnezyum klorür; 10 mM merkaptotanol; ve 0,1% DMSO) ile 20 µL reaksiyon hacminde gerçekleştirilecektir. Real-time QMSP reaksiyonu başına 3 µL bisulfit modifiye DNA gereklidir. Amplifikasyonlar 96 kuyulu platelerde Lightcycler 480 cihazında gerçekleştirilecek ve değerlendirilecektir.

Tablo 8. QMSP Deneylerinde Uygulanan Reaksiyon Karışımı ve Koşulları

Reaksiyon Karışımı		1 örnek hacmi
10X SensiFAST Probe No-ROX Kit Mix		10 µL
100 µM Primer (F)		1,2 µL
100 µM Primer (R)		1,2 µL
100 µM prob		0,4 µL
dH ₂ O (PCR grade)		2,2 µL
BcDNA		5,0 µL
PCR Aşamaları	T (°C)	Zaman
Denatürasyon	95°C	30 s
Bağlanma (50 Siklus)	95°C	15 s
	64°C	1 dk
	72°C	15s
Soğuma	40°C	30 s

Her bir reaksiyon aynı platformda en az 2 kez tekrarlanmıştır. Deneylerde, 5' ucunda 6-floroseinamidit (FAM) ve 3' ucunda FAM inhibe edici (quencher) olan karboksi tetra metil rodamin (TAMRA) ile işaretlenmiş TaqMan probu kullanılmıştır.

Deneyde kullanılan pozitif kontrol, sağlıklı bireyden alınmış lenfosit DNA'sı (LNDNA), SssI metilaz enzimi ile reaksiyona bırakıldı ve %100 metillendiğini bildiğimiz standart kullanıldı. Standartlar kantitatif sonuç elde etmek için, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 şeklinde dilüe edildi.

ACTB ve *NDUFB3* genleri için eşik değeri (threshold) belirlendi. Yüzde yüz metile olan standart ve standart dilüsyonlarının konsantrasyonları Ct değerlerine (floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü) göre, program ile standart eğri grafiği oluşturuldu. Relatif metilasyon yüzdesinin kantitatif tayini ilişkili genin internal kontrol olarak kullanılan gene oranı ile sağlanmaktadır (ilişkili gen/referans gen x 100).

3.2.8. QRT-PCR (SYBR Green Temelli Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR) Tekniği ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

RNA izolasyonları ve ardından cDNA sentezi gerçekleşen hastalara ait normal ve tümör doku ve sağlıklı mukoza örnekleri kullanılarak *NDUFB3* geni için tek seferde eş zamanlı olarak ekspresyon düzeyleri belirlenip karşılaştırılmıştır. PCR için QRT-PCR master mix ve cDNA ile uygun şekilde bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım 96 adet kuyu içerisinde tarafımızdan tasarlanacak olan seçtiğimiz genlere özgü primerleri içeren platelere her bir kuyucukta 20 µl olacak şekilde multichannel pipet ile dağıtılacaktır. Reaksiyon karışımı yüklendikten sonra plate'in üzeri sealer film ile kaplanacak ve cihazda uygun sıcaklık dereceleri ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9. QRT-PCR Deneylerinde Uygulanan Reaksiyon Karışımları ve Koşulları

PCR Aşamaları	T (°C)	Zaman
Denatürasyon	95°C	30 s
Bağlanma	95°C	15 s
(40 siklus)	60°C	1 dk
	95°C	10 s
Erime Erisi	60°C	20 s
(Melting Curve)	95°C	Cont.
Soğuma	40°C	30 s
Reaksiyon Karışımı	1 örnek hacmi	
10X SensiFAST SYBR NO-ROX Kit Mix		10 µL
100 µM Primer (F)		0,2 µL
100 µM Primer (R)		0,2 µL
dH ₂ O (PCR grade)		6,6 µL
cDNA		3 µL

Polimeraz zincir reaksiyon işlemi sonrasında genlerin relatif ekspresyon düzeyleri referans genlerin ekspresyon düzeyleri ile normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak incelenecektir.

3.2.9. Dataların İstatistiksel Olarak Analiz Edilmesi

Hastalara ait klinik parametrelerle elde edilen sonuçlar arasındaki ilişkilerin istatistiksel anlamlılığı SPSS 22 ve GraphPad 8 (ücretsiz deneme sürümü) programlarından yararlanılarak incelenmiştir. Hastaların elde edilen klinik parametreleri ile ekspresyon/metilasyon seviyelerinin karşılaştırılmaları için kıkare testi (Yates ve Fisher) ve Anova testi uygulandı. $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sağlıklı bireylerin örneklerinin ve hasta bireylere ait örneklerin metilasyon seviyelerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon Rank Testi analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Bireylerin Klinik ve Sağlıklı Bireylerin Demografik Bulguları

Çalışmaya 30 adet OSCC, 30 adet OPML hasta grubunun yanı sıra 15 adet sağlıklı olmak üzere toplam 75 kişi dahil edilmiştir.

Malin hasta grubunun ortalaması 58,6'dır (maksimum 85, minimum 33). Erkek oranı %73,3 (22/30) kadın oranı %26,7'dir (8/30). Hastaların %63,33'ü (19/30) sigara kullanmakta ve %10'u (3/30) alkol tüketmektedir. Malin hastalarında tümör anatomik olarak %33,33 (10/30) dil, %23,33 (7/30) bukkal mukoza, %13,33 (4/30) inferior alveolar arkus, %13,33 (4/30) ağız tabanı, %10 (3/30) retromolar trigon, %6,67 (2/30) sert damak tutulumu göstermiştir. Malin grubunda bulunan hastaların TNM sınıflamasına göre %53,33'ü (16/30) evre IV, %16,67'si (5/30) evre III, %20'si (6/30) evre II ve %6,6'sı (2/30) evre I'dir. 30 malin hasta grubunun %46,67'sinde (14/30) lenf nodu tutulumu görülürken, 4 hastada (%13,33) yüksek differasyon derecesi, 2 hastada (%6,66) metastaz görülmüştür.

Çalışmaya katılan premalin hasta grubunun yaş ortalaması 51,96'tür (maksimum 83, minimum 27). Premalin hasta grubunda kadın oranı %53,33 (16/30) ile erkek oranından %46,66 (14/30) fazladır. Hastaların %46,66'sı (14/30) sigara kullanmakta ve %13,33'ü (4/30) alkol kullanmaktadır. Premalin grubundaki hastalar patolojik tanılarına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre hastaların %83,33'u (25/30) benin, %16,33'ü (5/30) premalin tanısı almıştır.

Çalışmaya katılan sağlıklı bireylerin yaş ortalaması 54,73'tür (maksimum 75, minimum 42). Bu grupta erkek oranı %53,33 (8/15) kadın oranından %46,67 (7/15) fazladır ve katılımcıların %26,67'si (4/15) sigara, %26,67'si (4/15) alkol tüketmektedir.

Yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı gibi klinik parametreler birbirleri arasında karşılaştırılmıştır. Sigara kullanma oranı sağlıklı grupta, malin ve premalin gruba göre daha düşük olduğu görülmüştür (Tablo 11-12).

Tablo 10. Çalışmaya Katılan Hasta ve Sağlıklı Grupların Demografik Özellikleri

		Toplam (n=75)		Malin (n=30)		Premalin (n=30)		Sağlıklı (n=15)	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Yaş ortalaması		55,1		58,6		51,96		54,73	
Cinsiyet	Erkek	44	58,66	22	73,33	14	46,66	8	53,33
	Kadın	31	41,33	8	26,67	16	53,33	7	46,67
Sigara	Yok	35	46,67	11	36,67	13	43,33	11	73,33
	Var	40	53,33	19	63,33	17	56,67	4	26,67
Alkol	Yok	65	86,66	28	93,33	24	80,00	13	86,66
	Var	10	13,33	2	6,67	6	20,00	2	13,33

Tablo 11. Premalin Hasta Grubun Klinik ve Patolojik Verileri

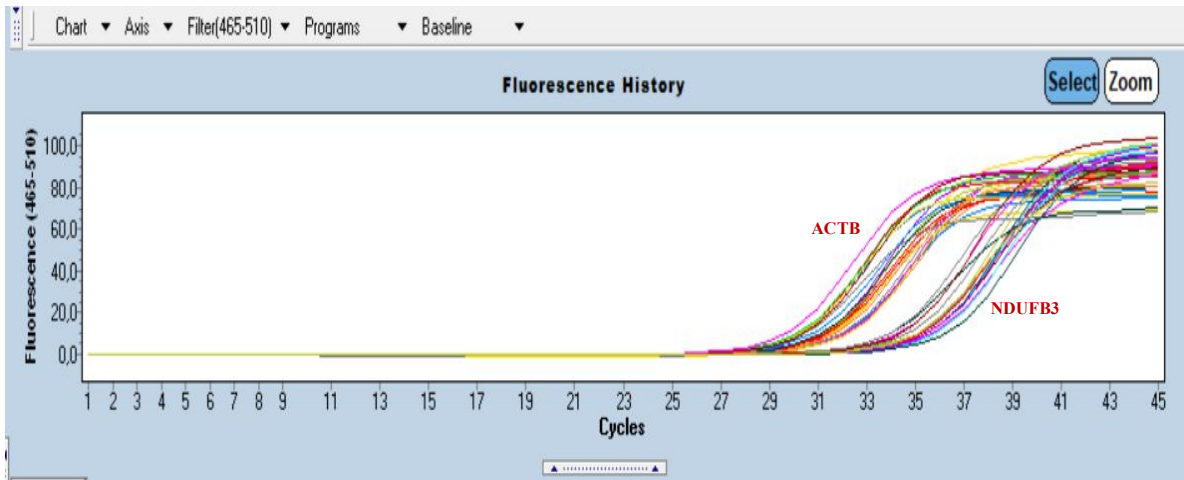
<u>PREMALİN</u>		n (%) (n=30)
Cinsiyet	Kadın	16 (%53,33)
	Erkek	14 (%46,66)
Yaş	≤50	15 (%50)
	>50	15 (%50)
Patoloji	OL	25 (%83,33)
	OLD	5 (%16,66)
	OP	
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13 (10%)
	Var (+)	17 (90%)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	24 (%80)
	Var (+)	6 (%20)

Tablo 12. Malin Hasta Grubun Klinik ve Patolojik Verileri

<u>MALİN</u>		n (%) (n=30)
Cinsiyet	Kadın	8 (%26,67)
	Erkek	22 (%73,33)
Yaş	≤50	8 (%30)
	>50	22 (%70)
Anatomik Tutulum	Dil	10 (%33,33)
	Bukkal Mukoza	7 (%23,33)
	Inferior Alveolar Arkus	4 (%13,33)
	Ağız Tabanı	4 (%13,33)
	Retromolar Trigon	3 (%10)
	Sert Damak	2 (%6,67)
Sigara Tüketimi	Yok	11 (%36,66)
	Var	19 (%63,33)
Alkol Tüketimi	Yok	28 (%93,33)
	Var	2 (%6,66)
Evre	I	3 (%10)
	II	6 (%20)
	III	5 (%16,67)
	IV	16 (%53,33)
Differasyon Derecesi	Düşük	2 (%6,66)
	Orta	24 (%80)
	Yüksek	4 (%13,33)
Lenf Nodu Tutulumu	Yok	16 (%53,33)
	Var	14 (%46,66)
Nüks	Yok	25 (%83,3)
	Var	5 (%16,67)

4.2. *NDUFB3* Genine Ait Verilerin Ekspresyon Analizleri

Çalışmamızda OSCC ve OPML tanısı almış 30'ar hastaya ait tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örnekleri ile 15 sağlıklı bireyin normal doku, serum ve tükürük örnekleri kullanılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerin örneklerinde ekspresyon seviyeleri, QRT-PCR tekniği kullanılarak incelendi (Şekil 13). Sonrasında hedef gen ve referans (*ACTB*) genlerinin ekspresyon sonuçlarından elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri tüm örnekler için normalize edildi. Sonuçların analizi Light Cycler480 yazılımındaki Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile yapılmıştır. OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusu, eşlenik normal doku, serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylere ait normal mukoza, serum ve tükürük örneklerindeki *NDUFB3* geninin ekspresyon düzeyleri ile referans genin (*ACTB*) ekspresyon düzeylerinin ΔCt değerleri hesaplandı (Şekil 14, 15, 16). OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusunun ΔCt değerlerinin normal dokunun ΔCt değerlerine göre fold change değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplanmıştır (Şekil 17). Buna göre 2'nin üzerinde olan değerler tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı dokulara oranla ekspresyon artışı, -2'nin altındaki değerler ise ekspresyon azalışı olarak değerlendirildi. OPML ve OSCC hastalarına ait tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon azalışı veya artışı ile hastalara ait klinikopatolojik bilgilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması SPSS 21 ve Graphpad 8 programı yardımıyla gerçekleştirildi.



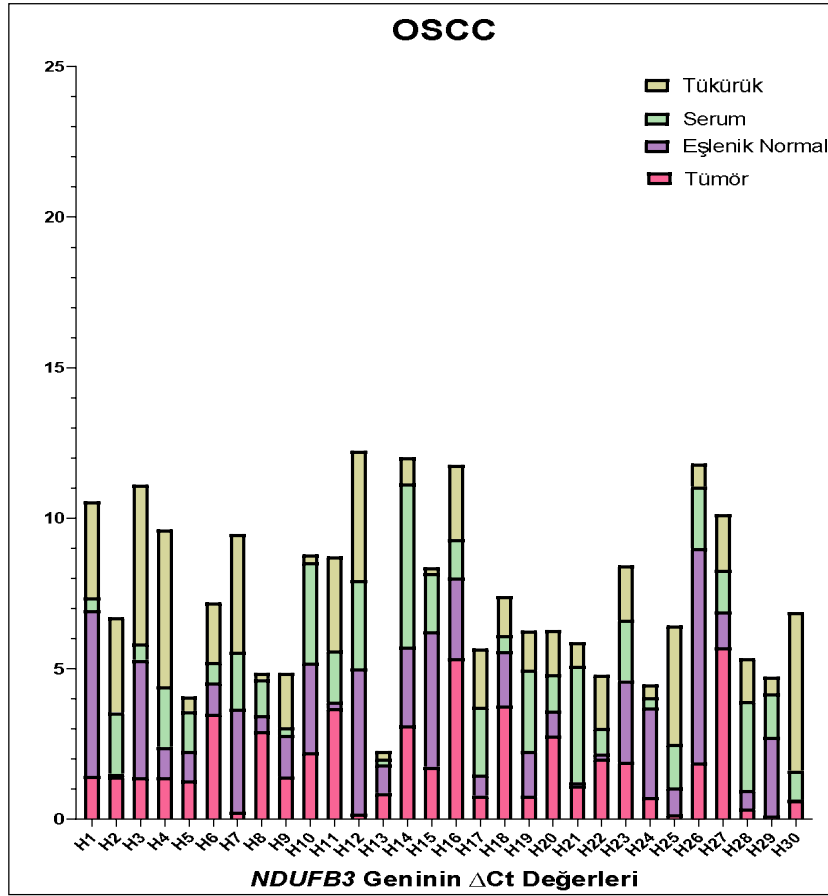
Şekil 13. Hastalara Ait Tümör ve Eşlenik Normal Dokuların Referans Gen (*ACTB*) ve Hedef Gendeki (*NDUFB3*) Amplifikasyon Eğrileri

Tablo 13. OSCC hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları (D. G.: değişiklik gözlemlenmeyen)

(n=30)		n (%)	Ekspresyon Azalma n (%)	Ekspresyon Artma n (%)	Ekspresyon Seviyesinde D. G. n (%)
Cinsiyet	Kadın	8 (26,67)	1 (12,5)	4 (50)	3 (37,5)
	Erkek	22 (73,33)	11 (50)	6 (27,27)	5 (22,72)
Yaş	≤50	9 (30)	4 (44,44)	3 (33,33)	2 (22,22)
	>50	21 (70)	8 (38,1)	7 (31,82)	6 (27,27)
Anatomik Tutulum	Dil	10 (33,33)	4 (40)	3 (30)	3 (30)
	Bukkal M.	7 (23,33)	2 (28,57)	3 (42,85)	2 (28,27)
	Inferior Al. Ark.	4 (13,33)	1 (25)	2 (50)	1 (25)
	Ağız Tabanı	4 (13,33)	3 (75)	0	1 (25)
	Paranasal Sinüs & Retromolar Trigon	3 (10)	2 (66,66)	0	1 (33,33)
	Sert Damak	2 (6,67)	0	2 (100)	0
Sigara Tüketimi	Yok	11 (36,66)	2 (18,18)	6 (54,54)	3 (27,27)
	Var	19 (63,33)	10 (52,63)	4 (21,05)	5 (26,31)
Alkol Tüketimi	Yok	28 (93,33)	11 (39,28)	8 (28,57)	9 (32,14)
	Var	2 (6,66)	1 (50)	1 (50)	0
Evre	I	3 (10)	2 (66,66)	0	1 (33,33)
	II	6 (20)	4 (66,66)	1 (16,66)	1 (16,66)
	III	5 (16,67)	2 (40)	1 (20)	2 (40)
	IV	16 (53,33)	4 (25)	8 (50)	4 (25)
Differasyon Derecesi	Düşük	2 (6,66)	2 (100)	0	0
	Orta	24 (80)	10 (41,66)	8 (33,33)	6 (25)
	Yüksek	4 (13,33)	1 (25)	2 (50)	1 (25)
Lenf Nodu Tutulumu	Yok	16 (53,3)	7 (43,75)	4 (25)	5 (31,25)
	Var	14 (46,67)	5 (35,71)	6 (42,86)	2 (14,29)

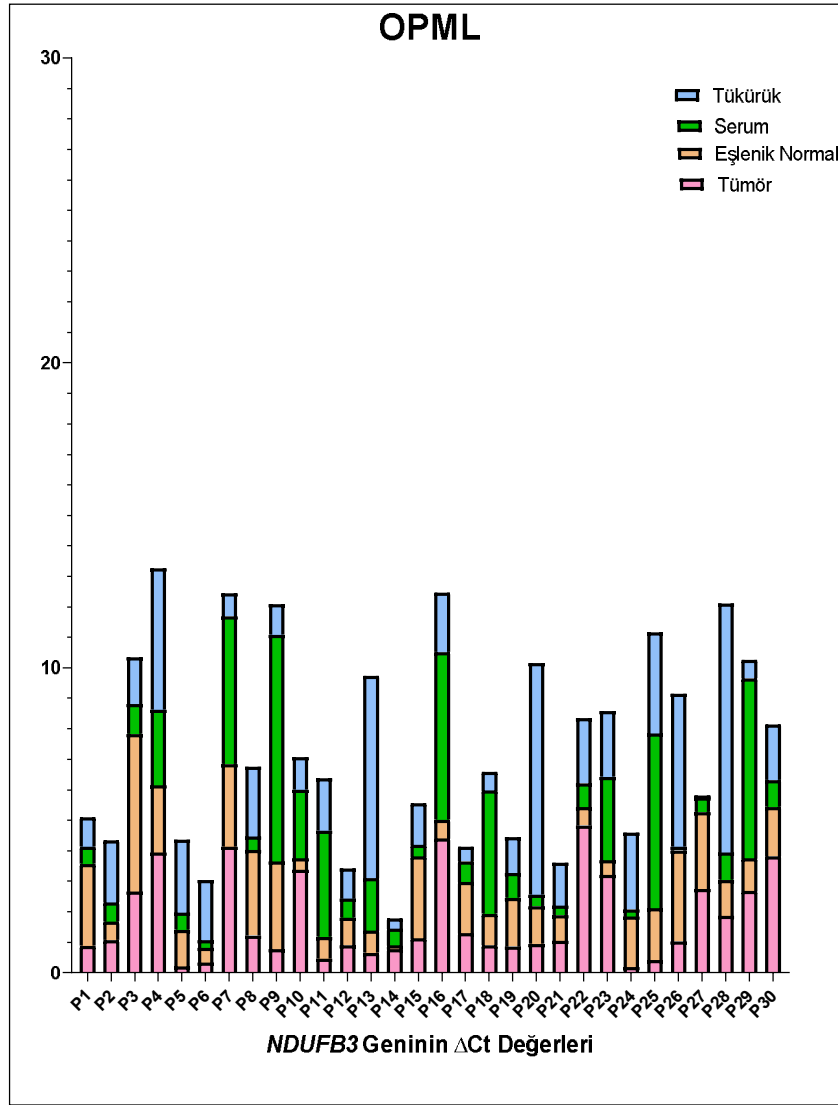
Tablo 14. OPML hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları

(n=30)		n (%)	Ekspresyonda Azalma n (%)	Ekspresyonda Artma n (%)	Ekspresyon Seviyesinde D. G. n (%)
Cinsiyet	Kadın	16 (53,33)	3 (18,75)	8 (50)	5 (31,25)
	Erkek	14 (46,66)	4 (28,27)	3 (21,43)	7 (50)
Yaş	≤50	15 (50)	4 (26,66)	6 (40)	5 (33,33)
	>50	15 (50)	3 (20)	5 (33,33)	7 (46,66)
Patoloji	Benin	25 (83,33)	6 (24)	8 (32)	11 (44)
	Premalin	5 (16,66)	1 (20)	3 (60)	1 (20)
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13 (43,33)	4 (30,77)	5 (38,46)	4 (30,77)
	Var (+)	17 (56,67)	3 (17,65)	6 (35,29)	8 (47,06)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	24 (80)	7 (29,17)	9 (37,5)	8 (33,33)
	Var (+)	6 (20)	0	2 (33,33)	4 (66,66)

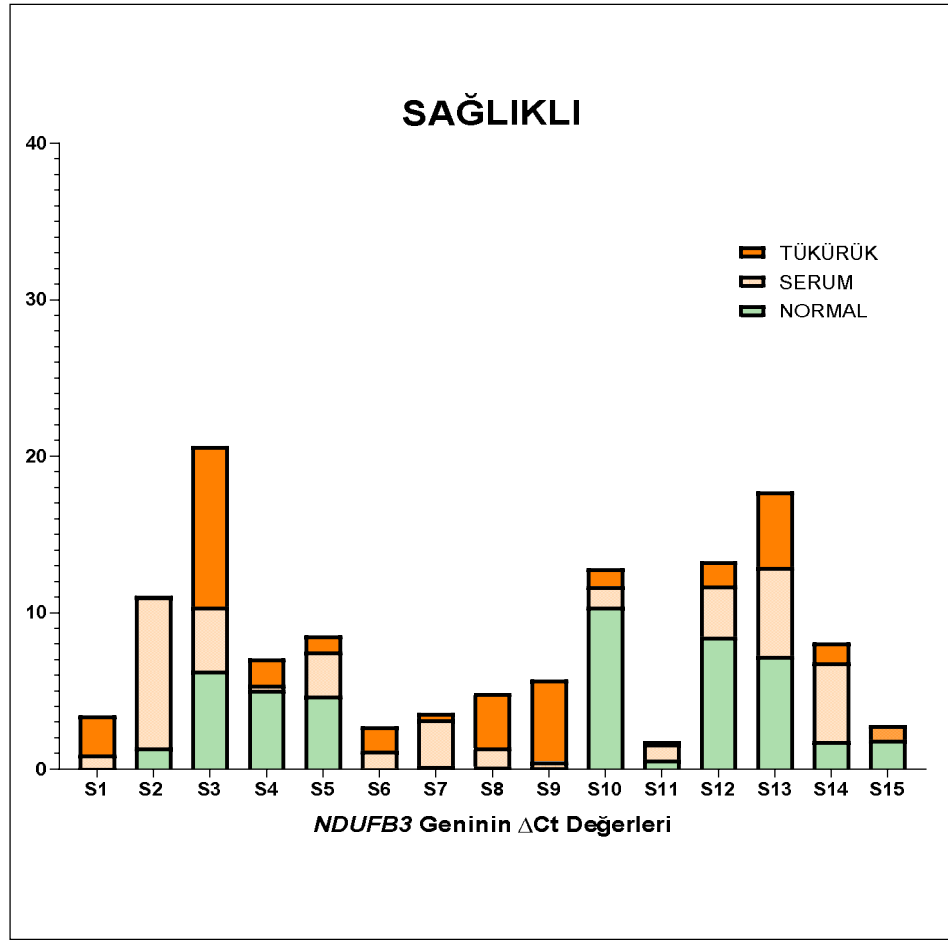


Şekil 14. OSCC hastalarının tümör, normal doku, serum ve tükürük örneklerindeki ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (H: OSCC hasta kodu)

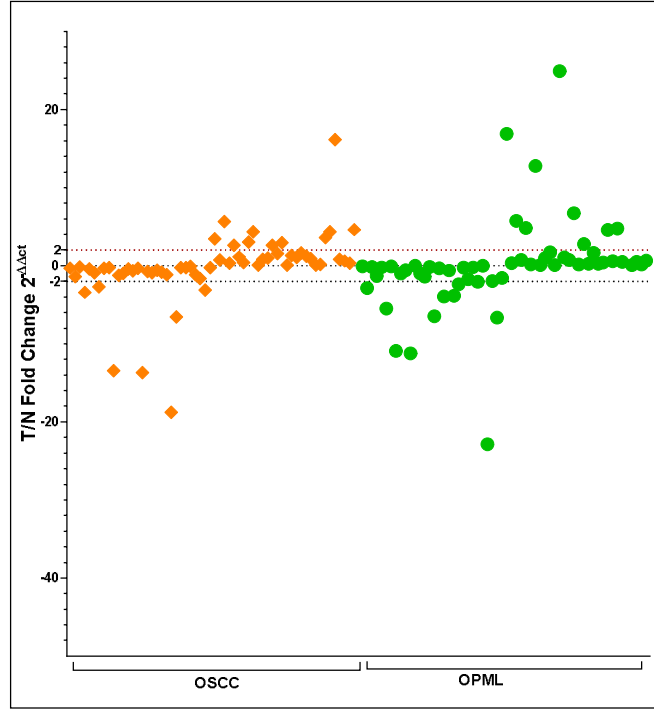
SPSS analizlerine (ki-kare testi) göre OSCC’de tümör ve eşlenik normal dokular arasında ileri dderecede anlamlılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Tümör ve serum örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p = 0,002$). Serum ve tükürük örnekleri arasında anlamlılık bulunmamıştır.



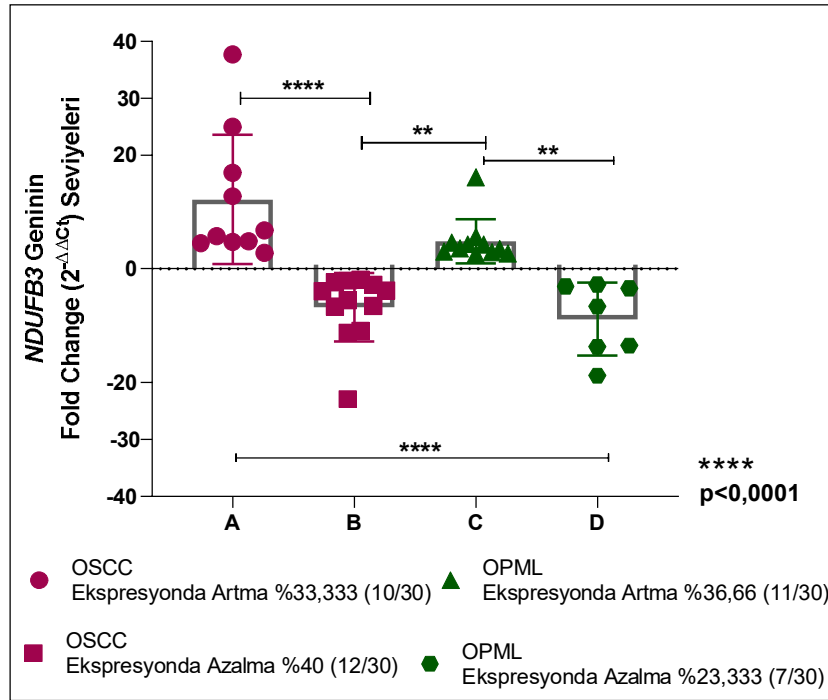
Şekil 15. OPML hastalarının tümör, kombine normal doku, serum ve tükürük örneklerindeki ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (P: OPML hasta kodu).



Şekil 16. Sağlıklı gruba ait normal mukoza, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (S: Sağlıklı birey kodlaması).



Şekil 17. OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusunun ΔC_t değerlerinin eşlenik/normal dokunun ΔC_t değerlerine göre kat değişim (fold change) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri (Turuncu OSCC hasta grubu, yeşil OPML hasta grubunu temsil etmektedir.)



Şekil 18. OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokularında eşlenik/normal dokularına göre relatif olarak hesaplanan ekspresyon düzeylerinin artma ve azalma oranları ($p<0,0001$) (A: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde artma, B: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde azalma, C: Premalin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde artma, D: Premalin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde azalma.)

(*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi)

OSCC hastalarından alınan tümör dokularında, eşlenik normal dokuya kıyasla ekspresyon seviyesinde artış %33,33 (10/30), ekspresyon seviyesindeki azalma %40 (12/30) ve %26,66'sında (8/30) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 18). OPML hastalarından alınan tümör dokularında, eşlenik normal dokuya kıyasla ekspresyon seviyesinde artış %36,66 (11/30), ekspresyon seviyesinde azalış %23,333 (7/30) gözlenirken, %40'ında (12/30) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 18). Analiz sonuçlarına göre (One-way ANOVA); OSCC grubunun ekspresyon seviyesindeki artma ve azalma arasında " $<0,0001$ ", OPML grubunun ekspresyon seviyesindeki artma ve azalma arasında " $<0,0079$ ", OSCC grubunun ekspresyon seviyesindeki azalma ve OPML grubunun ekspresyon seviyesindeki artma arasında " $<0,0068$ ", OSCC grubunun ekspresyon

seviyesindeki artma ve OPML grubunun ekspresyon seviyesindeki azalma arasında ise “<0,0001” p değerleri istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (p=0,0005).

SPSS analizine (Wilcoxon Rank Testi) göre OSCC grubunda tümör dokusunda ekspresyonda azalma ve ekspresyonda değişiklik gözlenmeyenler arasında anlamlılık tespit edilmiştir (p=0,012). Ekspresyon seviyesinde artma ve ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmeyenler arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir. OSCC grubunun eşlenik normal grubunda ekspresyon seviyesinde azalma ile ekspresyon seviyesi değişmeyenler arasında ve ekspresyon seviyesinde artma ile ekspresyon seviyesi değişmeyenler arasında p=0,025 değerinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir. OPML hasta grubunda ekspresyonda artma ve azalma arasında ileri derecede anlamlılık gözlenmiştir (p<0,001). OPML grubundaki tümör örneklerinin ekspresyon seviyesinde artma gözlenenler ile ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmeyenler arasında anlamlılık tespit edilmemiştir. Ekspresyon seviyesinde azalma gözlenenler ile ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmeyenler arasında p=0,018 değerinde anlamlılık bulunmuştur. OPML grubundaki eşlenik normal örneklerinin ekspresyon seviyesinde artma gözlenenler ile ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmeyenler arasında ve ekspresyon seviyesinde azalma gözlenenler ile ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmeyenler arasında istatistiksel bir anlamlılık gözlenmemiştir.

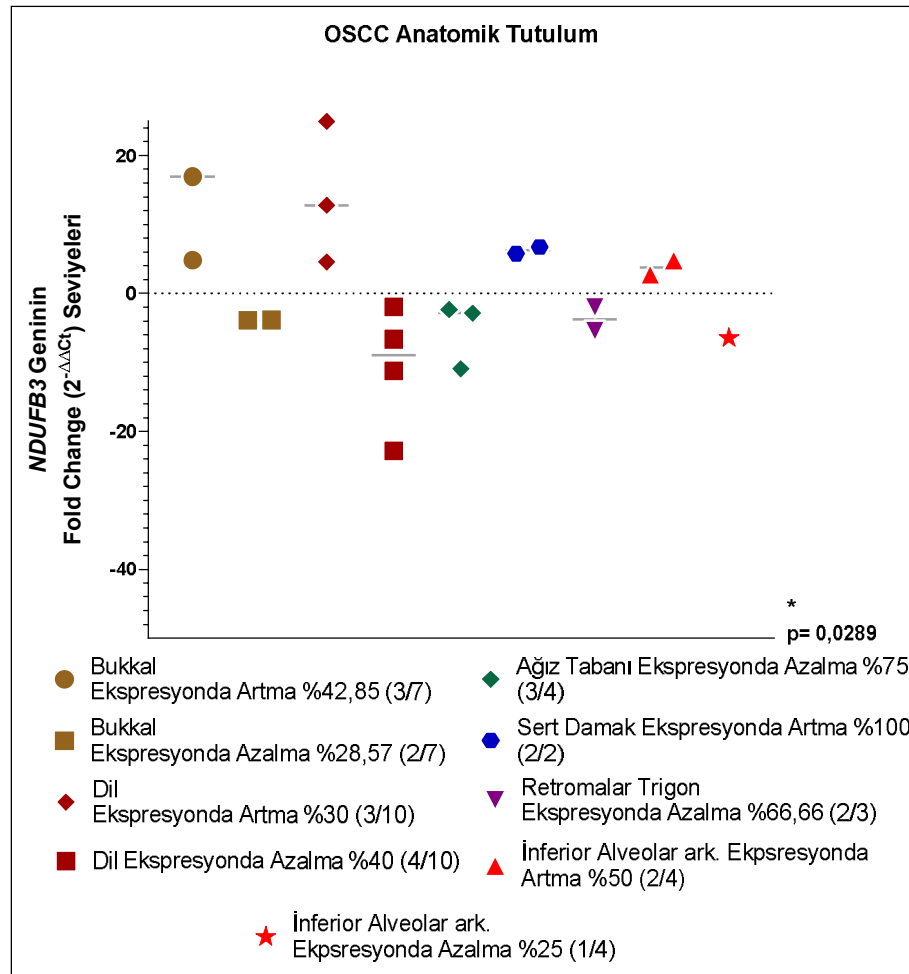
Tablo 15. OSCC/OPML hasta gruplarının tümör, eşlenik normal dokuları ile serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylerin mukoza, serum ve tükürük örneklerinin foldchange değerleri

	Tümör Dokusu & Sağlıklı Doku	Tümör Doku & Eşlenik Normal Doku	Serum Örneği & Sağlıklı Serum Örneği	Tükürük Örneği & Sağlıklı Tükürük Örneği
OSCC	-3,15142	1,053726	-3,96916	1,542745
OPML	-2,82908	1,089249	-8,38126	1,528553

OSCC ve OPML hastalarından alınan tümör dokusu, normal/eşlenik doku, serum ve tükürük numunelerinin ortalama Ct değerleri ile sağlıklı bireylere ait mukoza, serum ve tükürüğün Ct değerlerinin ortalaması karşılaştırılarak kat değişim değerleri (foldchange) hesaplandı. Sağlıklı bireylerin dokuları ve OSCC tümör dokuları birbiriyle kıyaslandığında -3,151416 kat, OSCC hastalarına ait tümör dokularıyla eşlenik-normal

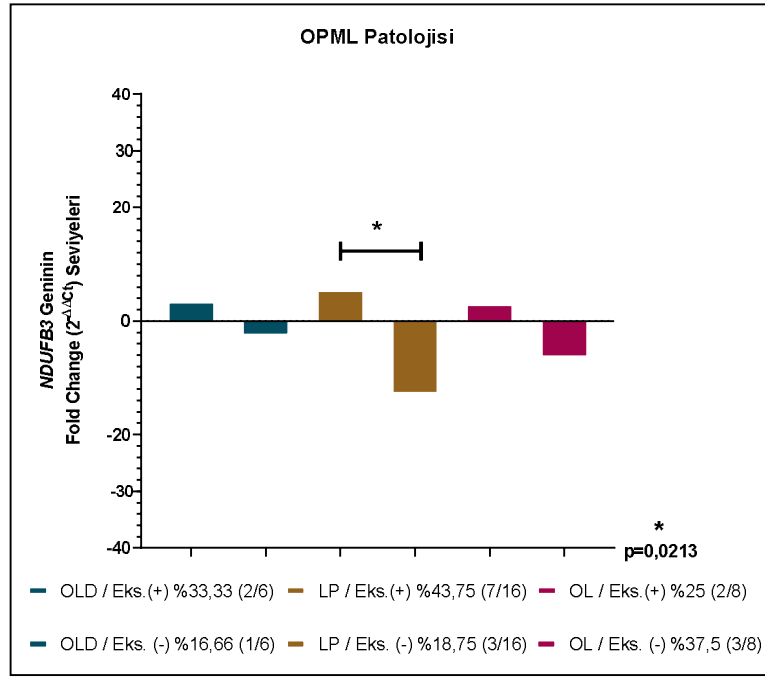
dokuları kıyaslandığında 1,053726 kat, sağlıklı bireylerin ve OSCC hastalarının serum ve tükürük örnekleri kıyaslandığında -3,96 ve 1,542745 kat *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyesinde değişim gözlenmiştir (Tablo 15).

Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, OPML hastalarının tümör dokularının Ct değerlerinde *NDUFB3* geninin ekspresyon düzeyinde -2,829081 katlık bir değişiklik gözlemlendi. OPML hastalarından alınan tümör dokularındaki ekspresyon seviyeleri eşlenik-normal dokuya kıyasla 1,089249 kat, OPML hastalarından alınan serum numunelerinde sağlıklı serum numunelerine kıyasla -8,38 kat ve OPML hastalarından alınan tükürük numunelerindeki ekspresyon seviyeleri sağlıklı tükürük örnekleriyle karşılaştırıldığında 1,528553 katlık bir değişiklik gözlenmiştir (Tablo 15).



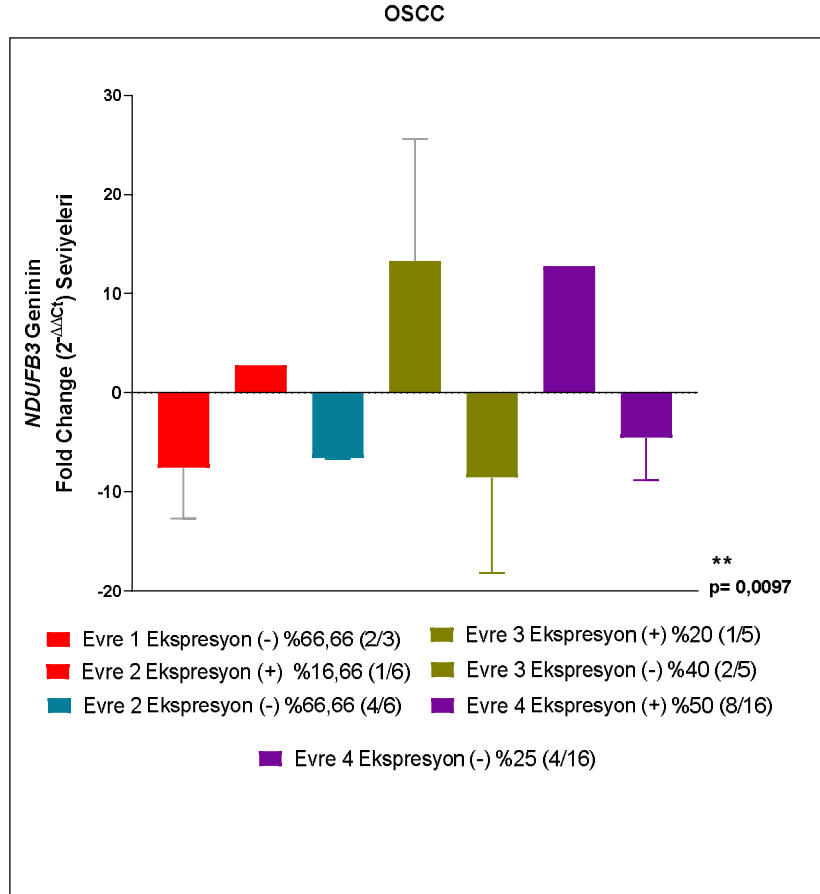
Şekil 19. OSCC hastalarının anatomik tutulumuna göre *NDUFB3* geninin ekspresyon düzeyleri (p=0,01733) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

OSCC hasta grubunun anatomik olarak etkilenen bölgesine göre (Şekil 19) ekspresyon seviyelerinde azalma ve artma gözlenen hastalar gösterilmektedir. ($p=0,0289$). Bukkal bölgede tutulum gösteren hastaların %42,85'inde (3/7) ekspresyon seviyesinde artma, %28,57'sinde (2/7) ekspresyon seviyesinde azalma ve %28,57'sinde (2/7) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ağız tabanında tutulumu bulunan hasta grubunun %75'inde (3/4) ekspresyon seviyesinde azalma görülürken, %25'inde (1/4) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Hasta grubunda dil bölgesinde tutulumu bulunanlar arasında %30'unda (3/10) ekspresyon seviyesinde artma, %40'ında (4/10) ekspresyon seviyesinde azalma ve %30'unda (3/10) ekspresyon seviyesinde herhangi anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Sert Damak bölgesinde tutulumu bulunan hastaların %100'ünde (2/2) ekspresyon seviyesinde artma gözlenmiştir. İnférieur Alveolar ark. anatomik bölgede tutulumu bulunan hastalarda %50'sinde (2/4) ekspresyon seviyesinde artma, %25'inde (1/4) azalma ve %25'inde (1/4) ise herhangi anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Retromolar Trigon bölgesinde tutulumu bulunan hasta grubunun %66,66'sında (2/3) ekspresyon seviyesinde azalma görülürken, %33,33'ünde (1/3) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. SPSS analizine göre (ki-kare testi) eşlenik normal dokulardaki serum örneklerinde anatomik tutulumda bukkal mukoza ve retromolar trigon arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmüştür ($p=0,036$).



Şekil 20. Premalin hasta grubunun patolojik gruplarına göre *NDUF3* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler (p=0,0213) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

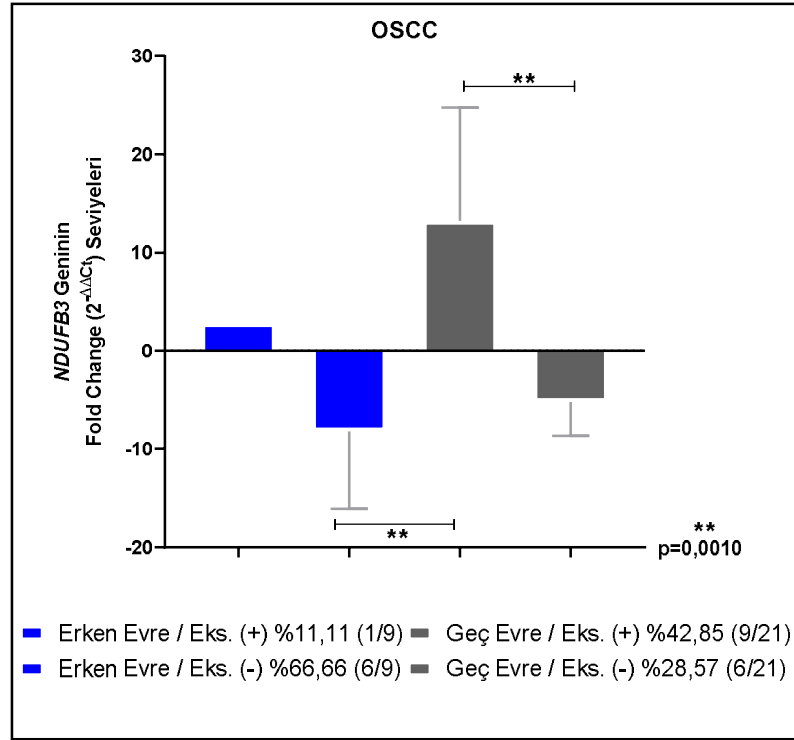
Şekil 20’de, OPML hasta grubunda gözlenen patolojiye göre değişen ekspresyon seviyeleri gösterilmektedir. OLD tanısı almış hasta grubunun %33,33’ünde (2/6) ekspresyon seviyesinde artma, %16,66’sında (1/6) azalma gözlenirken, %50’sinde (3/6) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. LP patolojili hasta grubunun %43,75’inde (7/16) ekspresyon seviyesinde artma, %18,75’inde (3/16) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %62,5’inde (10/16) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. OL patolojisine sahip hasta grubunda ise %25’inde (2/8) ekspresyon seviyesinde artma, %37,5’inde (3/8) azalma gözlenirken, %62,5’inde (5/8) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 21. Malin hasta grubunun evrelere göre *NDUF3* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler (p=0,0097) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

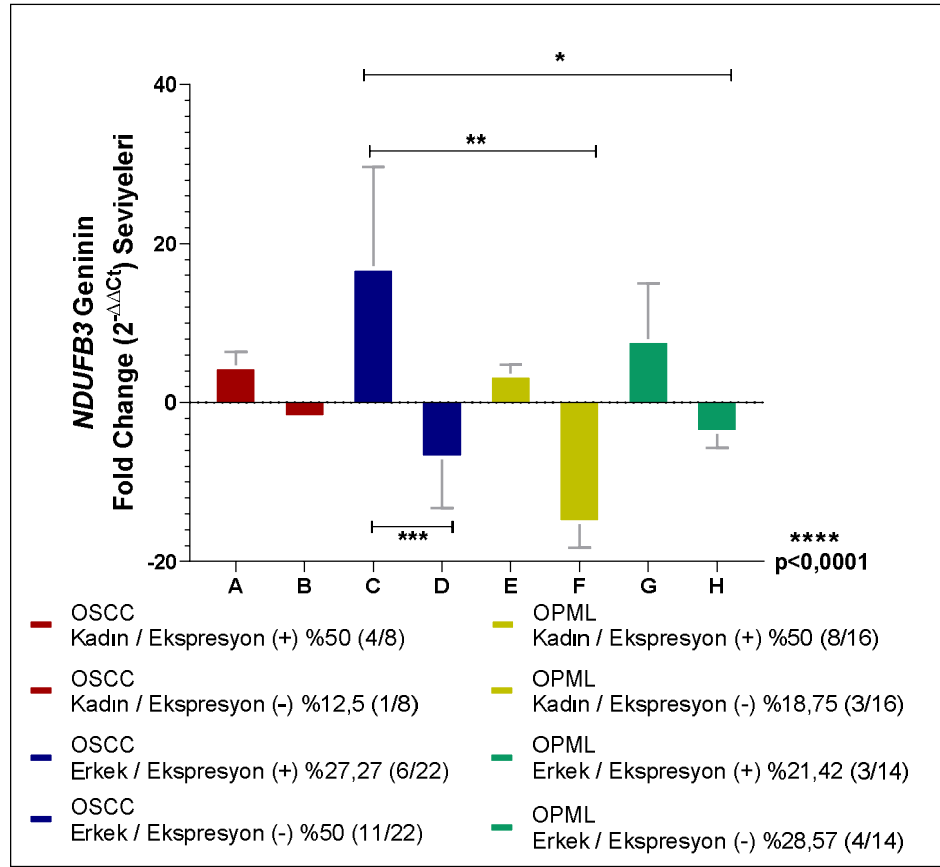
Şekil 21’de, malin hasta grubunun evresine göre artmış ve azalmış *NDUF3* geninin ekspresyon seviyelerine sahip hasta sayısını gösterilmektedir. Evre I OSCC hasta grubunun %66,66’sında (2/3) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %33,33’ünde (1/3) herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Evre II OSCC hasta grubunda %16,66’sında (1/6) ekspresyon seviyesinde artma, %66,66’sında (4/6) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiş ve %16,66’sında (1/6) herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Evre III OSCC hasta grubunun %20’sinde (1/5) ekspresyon seviyesinde artma görülürken, %40’ında (2/5) ekspresyon seviyesinde azalma meydana geldiği tespit edilirken %40’ında (2/5) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Evre IV hasta grubunun %50’sinde (8/16) ekspresyon

seviyesinde artma, %25’inde (4/16) azalma gözlenirken, hastaların %75’inde (12/16) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 22. Malin hasta grubunda *NDUF3* geninin erken ve geç evreye göre ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler (p=0,0010) (*:Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).**

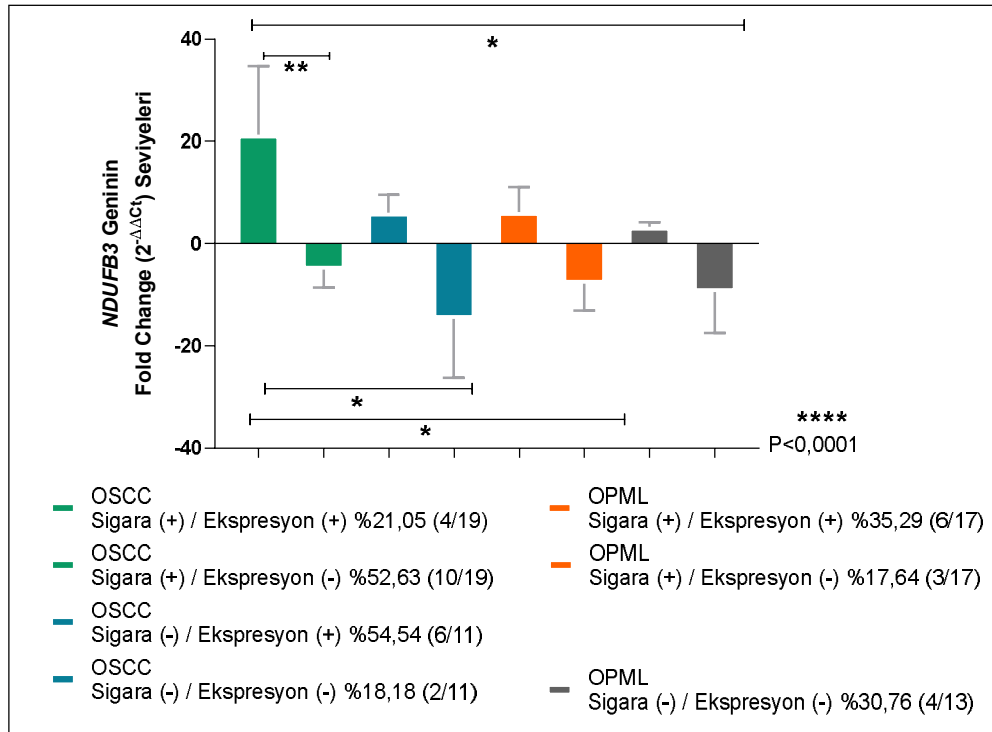
Şekil 22’deki grafikte malin hasta grubuna ait erken/geç evre OSCC hastalarında *NDUF3* geninin ekspresyon seviyelerinin artış ve azalış gösterilmektedir (p=0,0010). Erken evre OSCC hastalarının, %11,11’inde (1/9) artma görülürken %66,66’sında (6/9) ekspresyon seviyesinde azalma görülmektedir ve %22,22’sinin (2/9) ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Geç evre OSCC hastalarının %42,85’inde (9/21) ekspresyon seviyesinde artma, %28,57’sinde (6/21) azalma gözlenirken, %71,42’sinde (15/21) ekspresyon seviyelerinde herhangi anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kruskal-Wallis analizinin sonuçlarına göre erken evre ekspresyonda azalma ve geç evre ekspresyonda artma gösteren hasta grupları arasında “p=0,0027” değerinde anlamlılık gözlenmiştir. Geç evre ekspresyonda artma gösteren hastalar ile geç evre ekspresyonda azalma gösteren hastalar arasında ise “p=0,0079” değerinde anlamlılık gözlenmiştir.



Şekil 23. OSCC ve OPML hasta gruplarında cinsiyete bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde görülen değişiklikler ($p<0,0001$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

Şekil 23’de OSCC ve OPML hasta grubunda *NDUF3* geninin cinsiyete bağlı olarak ekspresyon seviyelerindeki artış ve azalış seviyelerindeki değişiklikler ve oranları gösterilmiştir ($p<0,0001$). OSCC hasta grubunda yer alan kadın hastaların %50’sinde (4/8) ekspresyon seviyesinde artma, %12,5’inde (1/8) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %37,5’inde (3/8) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. OSCC hasta grubunda yer alan erkek hastaların %27,27’sinde (6/22) ekspresyon seviyesinde artma, %50’sinde (11/22) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %22,72’sinde (5/22) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. OPML hasta grubunda yer alan kadın hastaların %50’sinde (8/16) ekspresyon seviyesinde artma, %18,75’inde (3/16) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %31,25’inde (5/16) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. OPML hasta grubunda yer alan

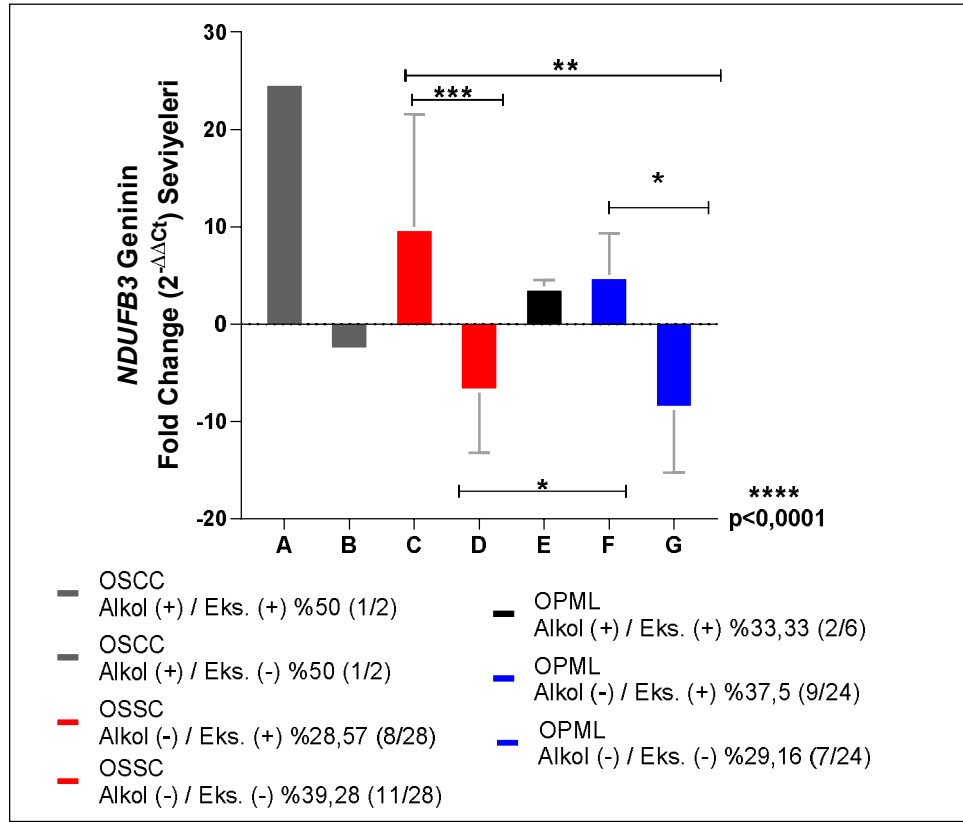
erkek hastaların %21,42'sinde (3/14) ekspresyon seviyesinde artma, %28,57'inde (4/14) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %50'sinde (7/14) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Kruskal-Wallis analizinin sonuçlarına göre; OSCC grubunda ekspresyon seviyesinde artma gözlenen erkek hastalar ile ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen erkek hastalar arasında “ $p=0,0003$ ” değerinde, OSCC grubunda ekspresyon seviyesinde artma gözlenen erkek hastalar ile OPML grubunda ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen kadın hastalar arasında “ $p=0,0015$ ” değerinde, OSCC grubunda ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen erkek hastalar ile OPML grubunda ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen erkek hastalar arasında “ $p=0,0497$ ” değerinde anlamlılık gözlemlendi.



Şekil 24. OSCC ve OPML hasta gruplarında sigara içen / içmeyen hastalar arasındaki ekspresyon artış ve azalış seviyelerindeki değişiklikler ($p < 0,0001$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

Şekil 24’de OSCC ve OPML hasta grubunda sigara içen/içmeyen hastaların *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerindeki artış ve azalış seviyeleri gösterilmiştir ($p < 0,0001$). OSCC hasta grubunda sigara içen hastaların %21,05’inde (4/19) ekspresyon seviyesinde artma, %52,63’ünde (10/19) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken,

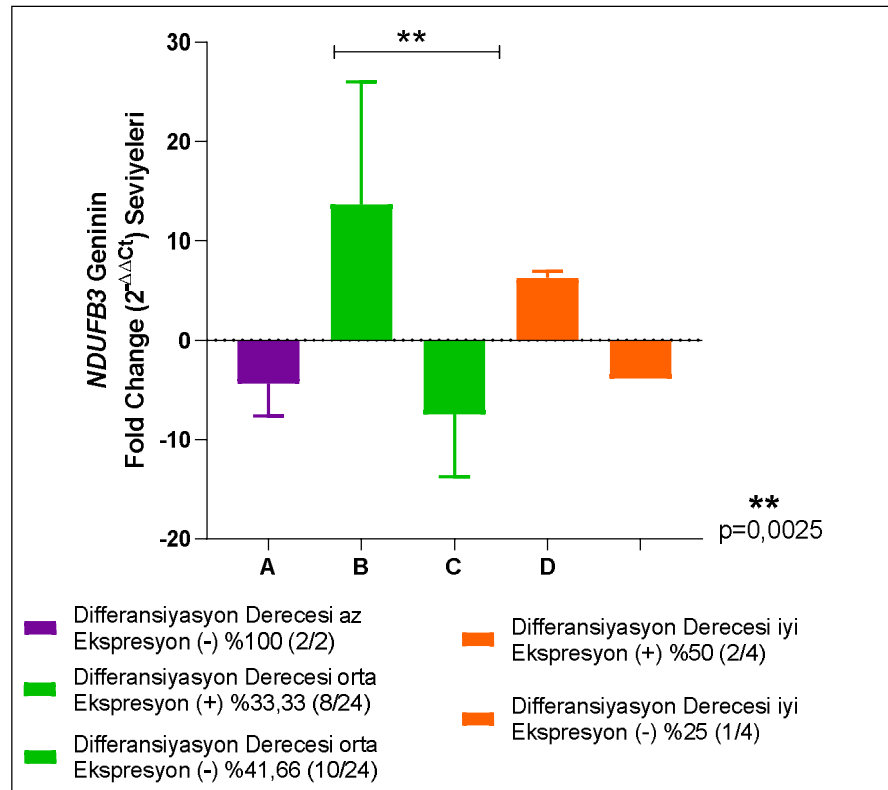
%26,31’inde (5/19) ekspresyon seviyesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. OSCC hasta grubunda sigara içmeyen hastaların %54,54’ünde (6/11) ekspresyon seviyesinde artış, %18,18’inde (2/11) ekspresyon seviyesinde azalış gözlenirken, %27,27’sinde (3/11) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. OPML hasta grubunda sigara içen hastaların %35,29’unda (6/17) ekspresyon seviyesinde artma, %17,64’ünde (3/17) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %47,05’inde (8/17) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. OPML hasta grubunda sigara içmeyen hastaların %38,46’sında (5/13) ekspresyon seviyesinde artma, %30,76’sında (4/13) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %30,76’sında (4/13) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Kruskal-Wallis analizi sonuçlarına göre; OSCC sigara içen grupta ekspresyonda artma ve OSCC sigara içen grupta ekspresyonda azalma arasında “ $p=0,0062$ ” değerinde, OSCC sigara içen grupta ekspresyonda artma gösteren grup ile OSCC sigara içmeyen ve ekspresyonda azalma gösteren grup arasında “ $p=0,0240$ ” değerinde anlamlılık gözlemlendi. OSCC sigara içen grupta ekspresyonda artma ile OPML sigara içen ve ekspresyonda azalma gösteren grup arasında “ $p=0,0241$ ” değerinde istatistiksel anlamlılık gözlemlendi. OSCC sigara içen grupta ekspresyonda artma ile OPML sigara içmeyen ve ekspresyonda azalma gösteren grup arasında “ $p=0,0141$ ” değerinde istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir.



Şekil 25. OSCC ve OPML hasta gruplarında alkol kullanan / kullanmayan hastalara arasındaki ekspresyon artma ve azalma seviyelerindeki değişiklikler ($p<0,0001$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

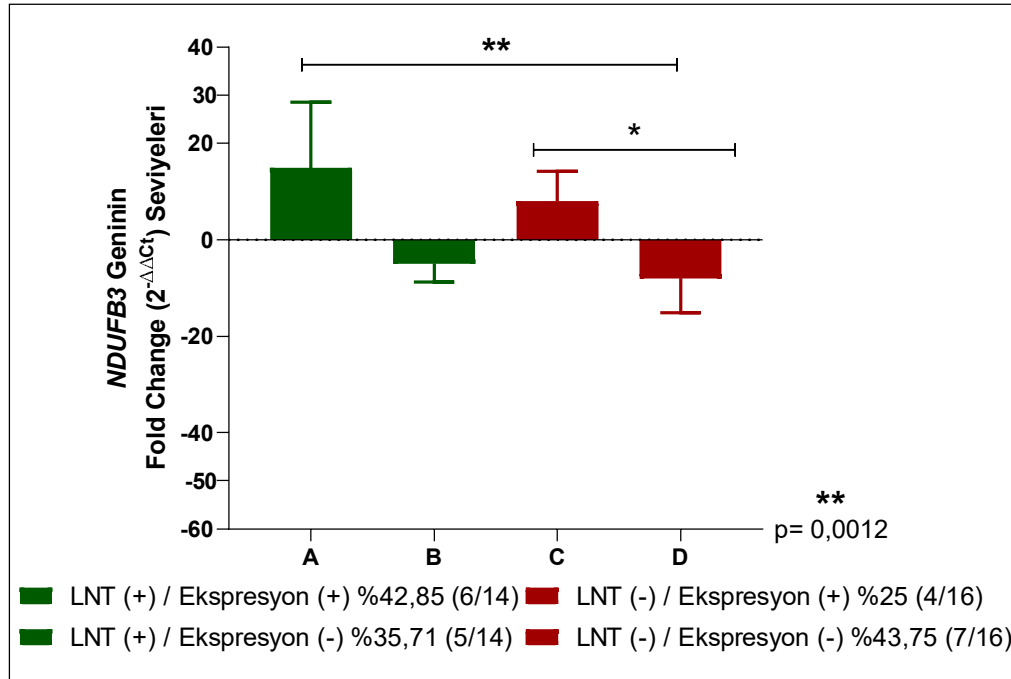
Şekil 25’de OSCC ve OPML hasta grubunda alkol içen/içmeyen hastaların *NDUF3* geninin ekspresyon seviyelerindeki artış ve azalış seviyeleri gösterilmiştir ($p<0,0001$). OSCC hasta grubunda alkol kullanan hastaların %50’sinde (1/2) ekspresyon seviyesinde artma, %50’sinde (1/2) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. OSCC hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların %28,57’sinde (8/28) ekspresyon seviyesinde artma, %39,28’inde (11/28) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %32,14’ünde (9/27) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. OPML hasta grubunda alkol kullanan hastaların %33,33’ünde (2/6) ekspresyon seviyesinde artma gözlenmişken hastaların %66,66’sında (4/6) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. OPML hasta grubunda alkol kullanmayan hasta grubunun %37,5’unda (9/24) ekspresyon seviyesinde artma, %29,16’sında (7/24) azalma gözlenirken, %33,34’ünde (8/24) ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Kruskal-Wallis analizinin sonuçlarına göre OSCC hasta

grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki artma ile OSCC hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki azalma arasında anlamlılık ($p=0,0008$) görülmüştür. OSCC hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki artma ile OPML hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki azalma arasında anlamlılık ($p=0,0013$) görülmüştür. OSCC hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki azalma ile OPML hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki artma arasında anlamlılık ($p=0,0304$) görülmüştür. OPML hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki artma ile OPML hasta grubunda alkol kullanmayan hastaların ekspresyon seviyesindeki azalma arasında anlamlılık ($p=0,0322$) görülmüştür.



Şekil 26. OSCC hasta grubunda *NDUF3* geninin differansiyasyon derecelerine göre ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler ($p=0,0025$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

Şekil 26'da OSCC hasta grubunun differansiyasyon dereceleri arasındaki *NDUFB3* geninin ekspresyon değişiklikleri gösterilmiştir ($p=0,0025$). Differansiyasyon derecesi az olan hasta grubunda %100'ünde (2/2) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Differansiyasyon derecesi orta olan hasta grubunda %33,33'ünde (8/24) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, %41,66'sında (10/24) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir ve %25'inde (6/24) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Differansiyasyon derecesi iyi olan hasta grubunda %50'sinde (2/4) ekspresyon seviyesinde artma, %25'inde (1/4) ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi ve hastaların %25'inde (1/4) anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kruskal-Wallis analizi sonuçlarına göre; differansiyasyon seviyesi orta olan hasta grubunun ekspresyon seviyesindeki artma ile differansiyasyon derecesi orta olan hasta grubunun ekspresyon seviyelerindeki azalma arasında " $p=0,0022$ " değerinde anlamlılık görüldü. SPSS analizine (ki-kare testi) göre OSCC tükürük örneklerinde differansiyasyon derecesi az ve orta olan örneklerin arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p=0,033$).

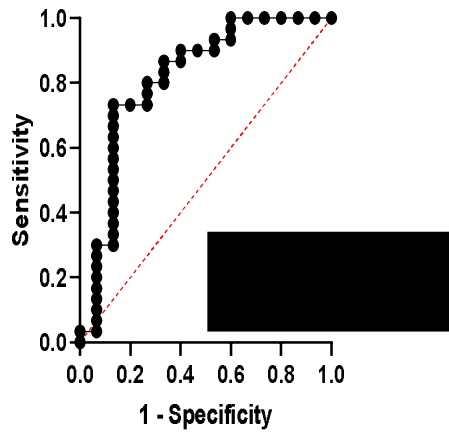


Şekil 27. Lenf nodu tutulumu olan/olmayan hastalar arasında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler ($p=0,0012$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

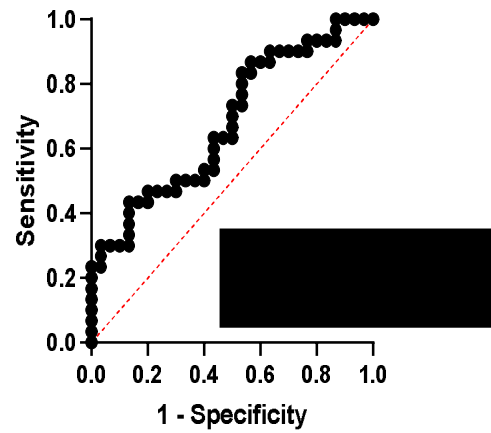
Şekil 27'de lenf nodu tutulumu olan ve olmayan OSCC hasta grupları arasındaki *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyesindeki değişiklikler gösterilmiştir. LNT (+) olan hasta

grubunun %42,85'inin (6/14) ekspresyon seviyesinde artma, %35,71'inde (5/14) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken, %21,42'sinde (3/14) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. LNT (-) olan hasta grubunun % 25'inde (4/16) ekspresyon seviyesinde artma, %43,75'inde (7/16) ekspresyon seviyesinde azalma görülürken, %31,25'inde (5/16) anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Kruskal-Wallis analizi sonuçlarına göre; LNT (+) hasta grubunun ekspresyonda artma seviyeleri ile LNT (-) hasta grubunun ekspresyonda azalma seviyeleri arasında “ $p=0,0048$ ” değerinde istatistiksel olarak anlamlılık görüldü. LNT (-) hasta grubunun ekspresyonda artma seviyeleri ile LNT (-) hasta grubunun ekspresyonda azalma seviyeleri arasında “ $p=0,0333$ ” değerinde istatistiksel olarak anlamlılık görüldü.

ROC curve: Sağlıklı Normal-Malin Tümör



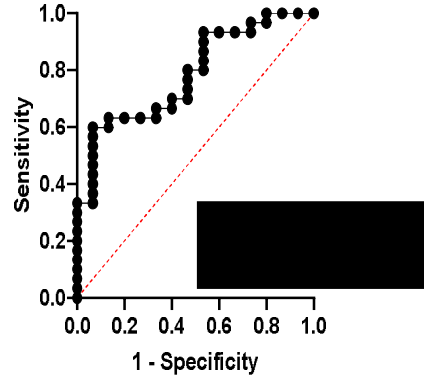
ROC curve: Malin Normal-Malin Tümör



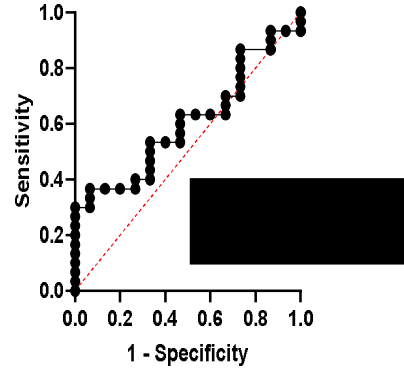
Şekil 28. OSCC grubuna ait doku örneklerinin ROC analizi. (A) Malin grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OSCC hasta grubunun tümör ile sağlıklı normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %73,33 duyarlılık %86,67 özgüllük ile duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 16'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 5,5 olarak belirlenebilir. OSCC grubunda tümör ile eşlenik normal dokularının *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %30 duyarlılık %96,67 özgüllük ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 16'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 9 olarak belirlenebilir (Şekil 28).

ROC curve: Sağlıklı Serum-Malin Serum



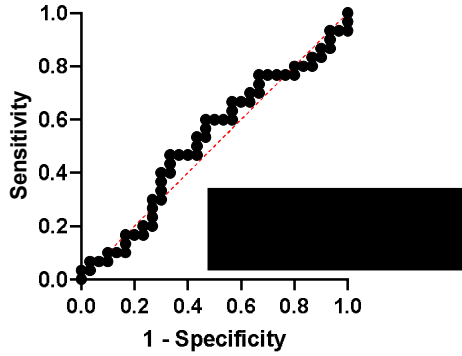
ROC curve: Sağlıklı Tükürük-Malin Tükürük



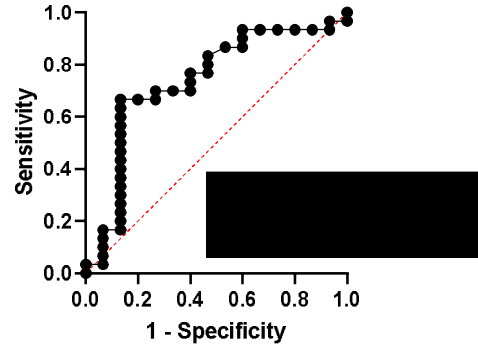
Şekil 29. OSCC vücut sıvı örneklerinin ROC analizi. (A) Malin grubunda serum ile sağlıklı serum *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grubunda serum ile sağlıklı serum *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OSCC hasta grubunun serum örnekleri ile sağlıklı grubunun serum örneklerinde *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %60 duyarlılık %93,33 özgüllük ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 17'ye göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 9 olarak belirlenebilir. OSCC grubunda tükürük örnekleri ile sağlıklı grubunun tükürük örneklerinde *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %36,67 duyarlılık %93,33 özgüllük ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 17'ye göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 5,5 olarak belirlenebilir (Şekil 29).

ROC curve: Pre Normal-Pre Tumor



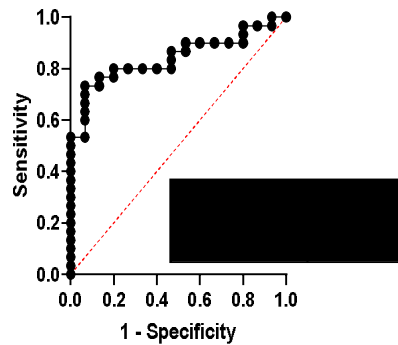
ROC curve: Sağlıklı Normal-Pre Tumor



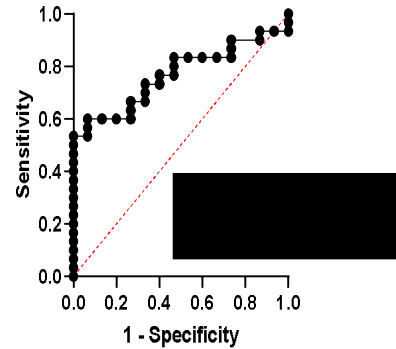
Şekil 30. OPML grubunun doku örneklerinin ROC analizi (A) Premalin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) OPML grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OPML grubunun tümör ile eşlenik normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %66,67 duyarlılık %96,67 özgüllük ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 16'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 5 olarak belirlenebilir. OPML grubunda tümör dokusu ile sağlıklı normal dokularında *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %66,67 duyarlılık %86,67 özgüllük ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 16'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 2 olarak belirlenebilir (Şekil 30).

ROC curve: Sağ Serum-Pre Serum



ROC curve: Sağ Tükürük-Pre-Tükürük



Şekil 31. OPML grubunun vücut sıvı örneklerinin ROC analizi (A) Premalin grubunda serum ile sağlıklı serum *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) OPML grubunda serum ile sağlıklı serum *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OPML hasta grubunun serum örnekleri ile sağlıklı grubunun serum örneklerinde *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %73,33 duyarlılık %93,33 özgüllük ile duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 17'ye göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 11 olarak belirlenebilir. OPML grubunda tükürük örnekleri ile sağlıklı grubunun tükürük örneklerinde *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %60 duyarlılık %93,33 özgüllük ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 17'ye göre özgüllük ve duyarlılık değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 9 olarak belirlenebilir (Şekil 31).

Tablo 16. OSCC ve OPML gruplarındaki Tümör-Eşlenik Normal ve Tümör-Sağlıklı Dokularda *NDUFB3* Genindeki Özgüllük, Duyarlılık ve Eşik Değerleri

	<i>Tümör Doku / Eşlenik Normal</i>			<i>Tümör Doku / Sağlıklı Doku</i>		
	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük
OSCC	9	30	96,66	5,5	73,33	86,67
OPML	5	66,67	96,67	2	66,67	86,67

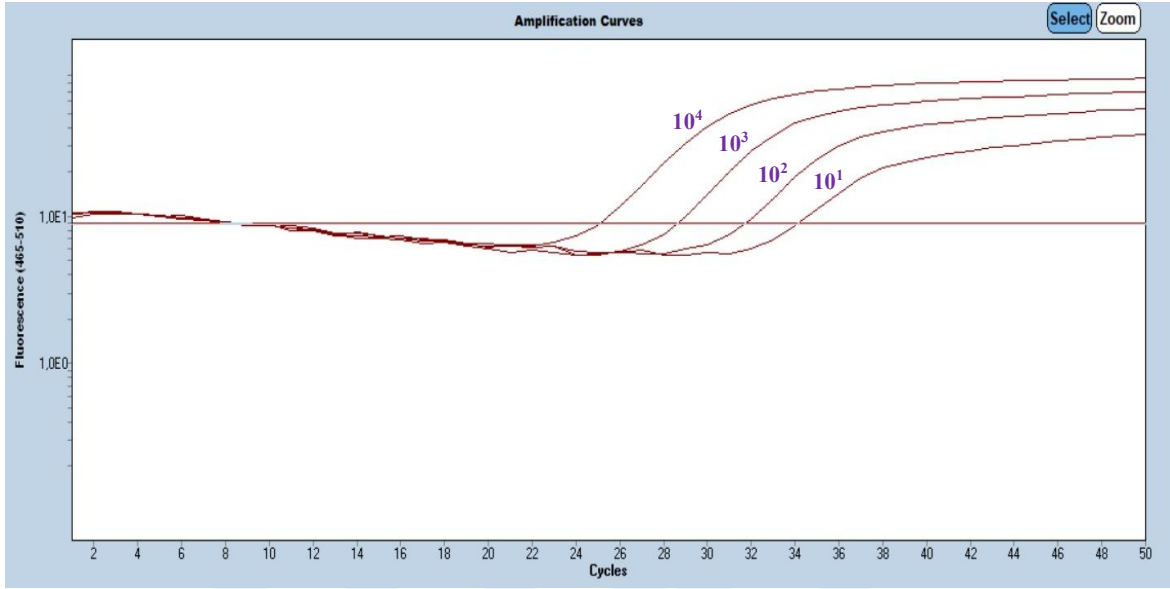
Tablo 17. OSCC ve OPML gruplarındaki Serum-Tükürük Örneklerindeki *NDUFB3* Geninde Özgüllük, Duyarlılık ve Eşik Değerleri

	<i>Serum / Sağlıklı Serum</i>			<i>Tükürük / Sağlıklı Tükürük</i>		
	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük
OSCC	9	60	93,33	5,5	36,67	93,33
OPML	11	73,33	93,33	9	60	93,33

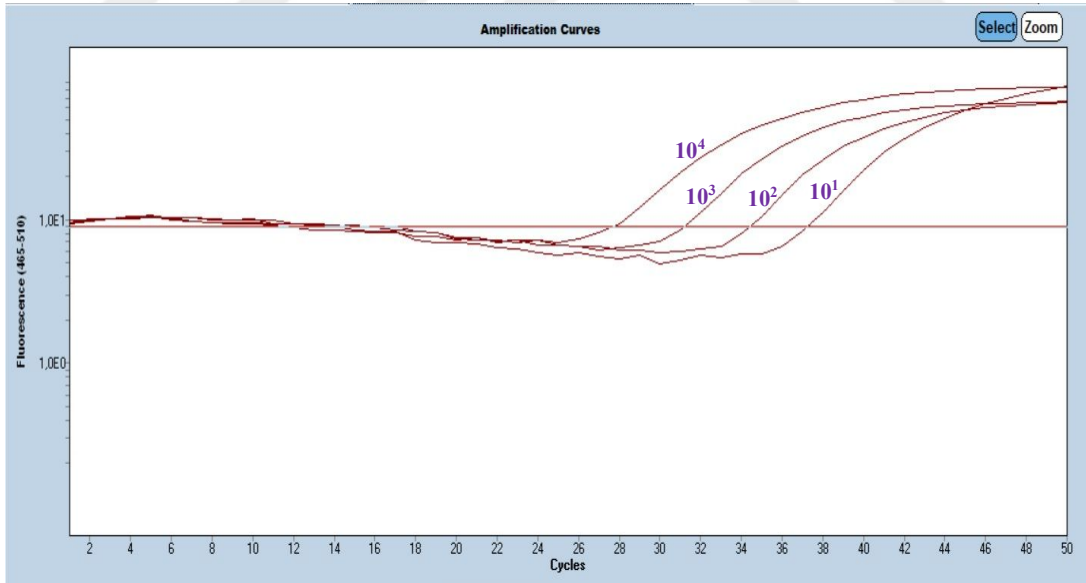
4.3. *NDUFB3* Genine Ait Verilerin Metilasyon Analizleri

Çalışmamızda, OSCC tanılı 30 hasta ve OPML tanılı 30 hastadan alınan tümör ve eşlenik-normal doku örnekleri ile ailesinde ve kendisinde malin/benin tümör hikayesi bulunmayan 15 sağlıklı bireyden normal mukozal örnekler alınarak metilasyon analizi için Kantitatif Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (QMSP) kullanılarak analiz edildi. Kantitatif ölçümler için, metillenmiş %100 standartlarımızı ve standartlardan (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) elde edilen dilüsyonlar kullanıldı. Elde edilen metilasyon verileri, LightCycler 480 yazılımı bulunan (Absolüt Hesaplama/Fit Points programı) kullanılarak analiz

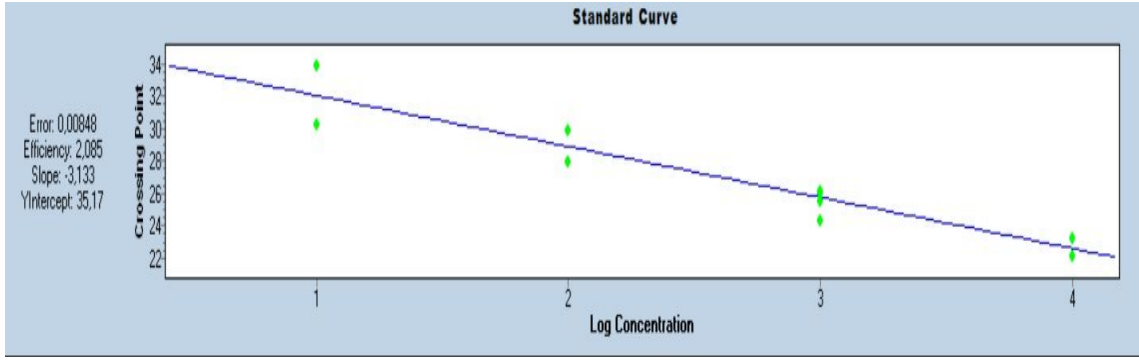
edildi. Referans genin (*ACTB*) amplifikasyon eğrisi Şekil 33'de hedef genin (*NDUFB3*) amplifikasyon eğrisi Şekil 34'de ve standart eğri Şekil 35'de gösterilmektedir.



Şekil 32. Referans Genin (*ACTB*) Amplifikasyon Eğrileri.

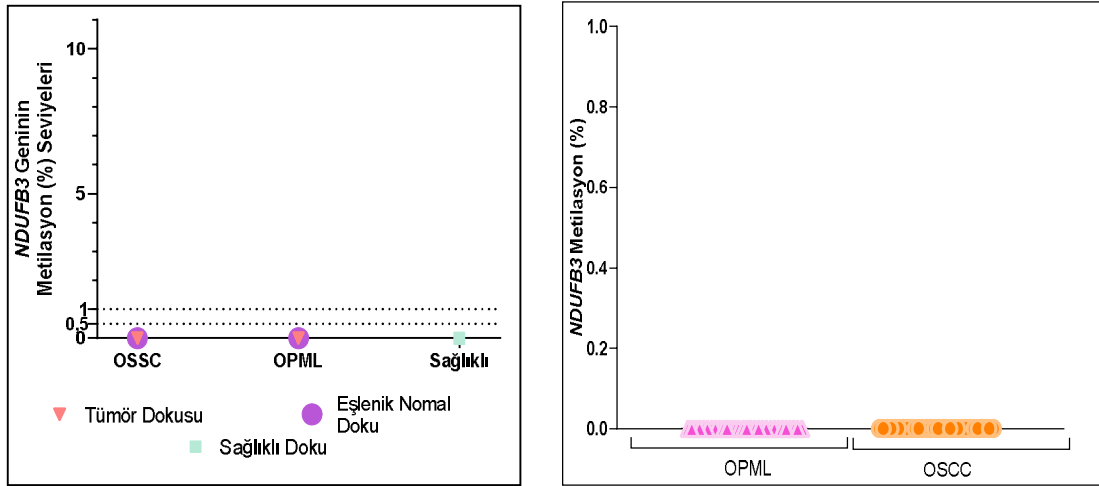


Şekil 33. Hedef Genin (*NDUFB3*) Amplifikasyon Eğrileri.



Şekil 34. Standart Curve Eğrisi.

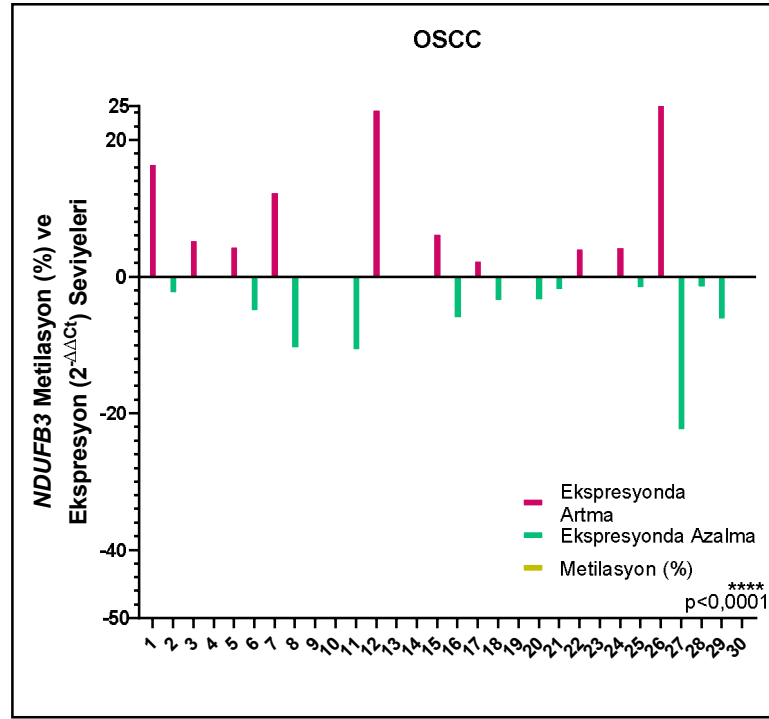
OSCC ve OPML hastalarının tümör, eşlenik normal doku ve alınan vücut sıvı örneklerinde *NDUFB3* geninin promotör bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon görülmedi.



Şekil 35. OSCC ve OPML Hastalarının Tümör ve Eşlenik Normal Dokularında ve Sağlıklı Dokuda *NDUFB3* Geninin Promoter Bölgesindeki Cpg Adacıklarındaki Metilasyon Seviyeleri.

4.3.1. Metilasyona Bağlı *NDUFB3* Genindeki Ekspresyon Seviyesinde Azalma

OSCC grubu hastalarının tümör ve eşlenik normal dokusunda *NDUFB3* gen promotör bölgesi metilasyonu gözlenmedi ve tümör dokusundaki ekspresyon seviyesinin eşlenik normal dokudakinden daha düşük olduğu doğrulandı. Şekil 36'de gösterilen OSCC hasta grubunda, tek yönlü Anova/Friedman test analizine göre metilasyon düzeyleri ile ekspresyonu azalmış hastalar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 36: OSCC Hasta Grubunda *NDUFB3* Geninin Ekspresyon ve Metilasyon Seviyelerinin One-way Anova Analizi İle Gösterimi (p< 0,0001).

5. TARTIŞMA

Oral kavite kanserleri, tüm dünyada en sık gözlenen 6. kanser tipi olup sigara ve alkol başta olmak üzere viral ajanlar, beslenme rutini, hijyen, genetik ve epigenetik faktörler ile birlikte oral premalin lezyonların varlığı oral kavite kanserinin en önemli etkenleri olarak bilinmektedir. Oral kavite kanserlerinin genellikle geç aşamada teşhis edilmesi mortalite oranında artmaya ve 5-yıllık sağkalım oranında azalmaya neden olmuştur. Ancak, oral kavite kanserlerinin erken evrede tanı konulması ya da oral premalin lezyonların erken teşhisi ile birlikte 5-yıllık sağkalım oranında ciddi artışlar gözlenmiştir. Oral premalin lezyonların teşhisi ve maliniteye dönüşüm riski yüksek oral premalin alt gruplarının belirlenmesi oral kavite kanserini önlemek için oldukça önemlidir (Abati ve diğerleri, 2020). Karsinogenezin erken aşamalarında veya benin/premalin lezyonların oluşumunda (hiperplazi, displazi vb.) oluşum süreçlerinde global DNA hipometilasyonu sıklıkla gözlenmektedir (Ehrlich, 2009b). Onkogenlerde gözlenen hipometilasyon gen aktivasyonunda artışa yol açarak hücrelerin tümörleşmesinde rol oynamaktadır. Bu nedenle, kanserin erken teşhisi, taraması ve takibinde onkogenlerin hipometilasyonu aday biyobelirteç olarak kullanılabileceği bilinmektedir. Demokan ve arkadaşlarının yapmış olduğu TÜBİTAK-SBAG-114S497 numaralı projesinde OPML'in farklı alt tiplerinin moleküler özelliklerini ve alt grupların maliniteye dönüşüm risklerini belirlemeyi amaçlamıştır. Bu nedenle malin, premalin ve sağlıklı gruplara ait doku örneklerinin metilasyon ve ekspresyon array analizleri gerçekleştirilerek elde edilen verilerin integratif biyoinformatik analizi sonucunda OPML alt grubunda hipometile olup ekspresyon seviyesinde artış gözlenen onkogenik karakterdeki *NDUFB3* geni tespit edilmiştir. Tez projemizde *NDUFB3* geninin sağlıklı grup ve OPML hasta gruplarındaki epigenetik ve genetik değişikliklerini daha geniş hasta grubunun doku ve vücut sıvısı örneklerinde değerlendirdik. Aynı zamanda *NDUFB3* geninin malinitedeki farklılıkları tespit etmek ve sağlıklı grupta premalin ön tansını sağlamak amacıyla taramada *NDUFB3* geninin metilasyon ve ekspresyon durumlarının tarama amaçlı biyobelirteç olarak kullanılma potansiyelini değerlendirdik.

OPML hasta grubunun ekspresyon seviyelerini incelediğimizde tümör dokusunun eşlenik normal dokuya kıyasla bireylerin yaklaşık %36'sında ekspresyon seviyesinde artma, yaklaşık %23'ünde ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi. OSCC hastalarının

tümör dokusundaki ekspresyon seviyesindeki değişiklikler ile eşlenik normal dokudaki ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri karşılaştırdık. Hastaların yaklaşık %33'ünde eşlenik normal dokuya kıyasla ekspresyon seviyesinde artma, %40'ında azalma tespit ettik.

OPML ve OSCC hastalarının tümör örneklerinin hiçbirinde metilasyon gözlenmediği bu nedenle metilasyon dışındaki farklı bir mekanizmanın etkili olabileceğini düşündük. Literatürleri incelediğimizde *NDUFB3* geninin metilasyon durumunun oral kavite malin ve premalin tümörlerinde etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

NDUFB3 geninin ekspresyon durumlarının incelendiği nazofaringial, meme kanseri ve nöroblastoma hücre soylarında yapılan çalışmalar mevcuttur. Çalışmamız, *NDUFB3* geninin oral kavite kanserlerinde çalışılan ilk çalışmadır ve bu anlamda literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Literatürde, *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerini baş-boyun kanserlerinde inceleyen sadece 3 çalışma bulunup çalışmaların ikisinin tiroid kanserlerinde ve bir tansesinin ise nazofariyal kanser türünde yapıldığı gösterilmiştir (Chung ve diğerleri, 2020; Lee ve diğerleri, 2015; Zhu, Zheng, Lu, Zheng ve Liu, 2022). Chung ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladığı çalışmada nazofaringiyal karsinomada *NDUFB3* ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda *NDUFB3*'ün ekspresyonunda artış gözlenmiştir ve bu artışın NLRP3 inflamatuvarlarının oluşumunu ve aktivasyonunu ve ardından preapoptozun oluşumunu ve aktivasyonunu destekleyen mitokondriyal ROS (mtROS) üretimine yol açtığını tespit edilmiştir (Chung ve diğerleri, 2020). Çalışma sonuçlarımıza göre, OSCC hastalarının %26'sında ekspresyon seviyesinde artma olduğu gözlenmiştir. Lee ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada papiller tiroid karsinomada (PTC) *NDUFB3* geninin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Hem tümör dokularında hem de eşlenik normal dokularda yapılan RT-PCR analizlerinde ameliyat öncesi 18F - florodeoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (18F - FDG PET) görüntülemesi mevcut olan 12 hasta arasından 10 hastada *NDUFB3* ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre PTC hücrelerinin enerji ihtiyaçları için öncelikle aerobik glikolize dayandığı yorumu yapılabilir. 18F-FDG PET görüntüleme, 12 vakanın tümünde PTC'lerin tiroid bezinde artan 18F-FDG alımı ile nodüler bir lezyona sahip olduğunu gösterdi bu da yüksek glikolitik aktiviteyi düşündürür (Lee ve diğerleri, 2015). Zhu ve arkadaşlarının 2022 yılında yayımladığı makalede farklı evrelere ait 510 tiroid kanseri hastasının dokuları incelenmiştir. Çalışmaya göre, *NDUFB3*'ün düşük ekspresyonu

ileri TNM evresine sahip hasta grubuyla ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar *NDUFB3*'ün tiroid kanserleri için prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini vurgulamışlar ve yüksek oranda eksprese edilen *NDUFB3*'ün tiroid kanseri ilerlemesini engelleyebileceği olasılığı belirtmişlerdir. Ayrıca tiroid kanseri hücrelerinde *NDUFB3*'ün kompleks I aktivitesini, mitoROS oluşumunu ve ATP seviyelerini arttırdığını ve mitokondri sayısında değişiklik olmamasına rağmen mitokondriyal solunumu iyileştirdiğini belirtmektedir (Zhu, Zheng, Lu, Zheng ve Liu, 2022). Çalışmamızda, *NDUFB3* geninin OSCC tanılı hastaların %40'da ve OPML hastalarının ise %23'ünde ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edildi. Buna karşılık, OPML hasta grubumuzun %36'sında ekspresyon seviyesinde artma olduğu gözlemlendi. Malin hasta grubumuzda *NDUFB3* genindeki ekspresyon durumunun ekspresyon azalışı yönünde olduğu ve ekspresyon azalışının malinite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Literatürde baş-boyun kanserleri dışında sadece meme kanserinde *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyelerini inceleyen iki farklı çalışma bulunmaktadır (Liu ve diğerleri, 2021; Tran, Leflein, Gonzalez ve Kleer, 2021). Liu ve arkadaşlarının yaptığı farklı doku sertliğine sahip meme kanseri hücrelerinde *NDUFB3* ekspresyon seviyeleri qPCR yöntemiyle incelenmiştir. Buradaki amaç artan meme dokusu sertliğinin meme kanseri ilerlemesinde belirleyici bir özellik olmasının ardındaki moleküler süreçleri açıklamaktır. Doku sertliği arttıkça *NDUFB3* ekspresyonunda artış gözlenmiştir (Liu ve diğerleri, 2021). Meme kanseri ile ilgili Tran ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptığı çalışmada ise metaplastik meme karsinomu (MBC) çalışması için *Ccn6* knockout fare modellerinde *NDUFB3*'ün potansiyel rolü araştırılmış ve kontrol fare grubuna kıyasla hedef fare grubundaki MBC'lerde *NDUFB3* ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde azalmış olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler birlikte incelendiğinde *Ccn6* knockout'unun, MBC gelişmeden önce meme epitelindeki redoks genlerinin downregülasyonuna yol açtığı sonucuna ulaşmışlardır (Tran, Leflein, Gonzalez ve Kleer, 2021).

Literatürde, *NDUFB3* geninin karsinogenezde metilasyon durumunu inceleyen tek bir çalışma bulunmaktadır. Noesel ve arkadaşlarının 22 nöroblastoma hücre soyunda yaptıkları çalışmada *NDUFB3* geninin promoterle ilişkili CpG adacıkları tüm nöroblastom hücre hatlarında ve normal dokularda metillenmediği bildirilmiştir (Van Noesel ve diğerleri, 2003). Biz de çalışmamızda, OSCC ve OPML hastalarına ait tümör ve eşelenik normal doku örneklerinde metilasyon gözlemedik. Ayrıca, sağlıklı grubumuza ait normal

mukoza örneklerinde de metilasyona rastlanmadı. Tüm sonuçlar ışığında, *NDUFB3* geninin metilasyonunun oral kavite karsinogenezi ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızdaki *NDUFB3* geninin ekspresyon sonuçları literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla da desteklenmiştir. OPML grubunda ekspresyon seviyesindeki artışın daha fazla olması ve malin grupta ise *NDUFB3* geninin ekspresyon seviyesinde azalmanın gözlemlendiği hasta sayısının fazla olması, *NDUFB3* geninin spesifik olarak ekspresyon azalışının maliniteye yatkınlığı desteklediği gözlenmiştir. Oral karsinogenezde *NDUFB3* geninin metilasyonunun etkili olmadığı gözlenmiştir. Oral kavitenin premalin ve malin lezyonlarında geniş hasta gruplarında ileri validasyonu yapılarak ekspresyon tabanlı biyobelirteç olma potansiyelinin araştırılmasına yönelik daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abati, S., Bramati, C., Bondi, S., Lissoni, A. ve Trimarchi, M. (2020). Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 9160, 17(24), 9160. doi:10.3390/IJERPH17249160
- Aida, J., Izumo, T., Shimomura, N., Nakamura, K. ichi, Ishikawa, N., Matsuura, M., ... Takubo, K. (2010). Telomere lengths in the oral epithelia with and without carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 46(2), 430–438. doi:10.1016/J.EJCA.2009.10.018
- Aida, J., Kobayashi, T., Saku, T., Yamaguchi, M., Shimomura, N., Nakamura, K. I., ... Takubo, K. (2012). Short telomeres in an oral precancerous lesion: Q-FISH analysis of leukoplakia. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 41(5), 372–378. doi:10.1111/J.1600-0714.2011.01120.X
- Alam, S., Ali, I., Giri, K. Y., Gokkulakrishnan, S., Natu, S. S., Faisal, M., ... Sharma, H. (2013). Efficacy of aloe vera gel as an adjuvant treatment of oral submucous fibrosis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 116(6), 717–724. doi:10.1016/J.OOOO.2013.08.003
- Allameh, A., Moazeni-Roodi, A., Harirchi, I., Ravanshad, M., Motiee-Langroudi, M., Garajei, A., ... Mesbah-Namin, S. A. (2019). Promoter DNA Methylation and mRNA Expression Level of p16 Gene in Oral Squamous Cell Carcinoma: Correlation with Clinicopathological Characteristics. *Pathology & Oncology Research*, 25(4), 1535–1543. doi:10.1007/s12253-018-0542-1
- Aloua, R., Opoko, U., Kerdoud, O., Hmoura, Z. ve Slimani, F. (2021). Mucoepidermoid carcinoma of the retromolar trigone in an elderly female: A case report. *Annals of Medicine and Surgery*, 67(June), 102487. doi:10.1016/j.amsu.2021.102487
- Alsofyani, A. A., Alsiary, R. A., Samkari, A., Alhaj-Hussain, B. T., Khan, J. A., Al-Maghrabi, J., ... Dallol, A. (2017). Prognostic potential of KLOTHO and SFRP1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Genetics*, 58(4), 459–465. doi:10.1007/S13353-017-0404-7/FIGURES/3
- Alston, C. L., Howard, C., Oláhová, M., Hardy, S. A., He, L., Murray, P. G., ... Taylor, R.

- W. (2016). A recurrent mitochondrial p.Trp22Arg NDUF3 variant causes a distinctive facial appearance, short stature and a mild biochemical and clinical phenotype. *Journal of Medical Genetics*, 53(9), 634–641. doi:10.1136/JMEDGENET-2015-103576
- Alyasiri, N. S., Ali, A., Kazim, Z., Gupta, S., Mandal, A. K., Singh, I. ve Rizvi, M. A. (2013). Aberrant promoter methylation of PTEN gene among Indian patients with oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Biological Markers*, 28(3), 298–302. doi:10.5301/JBM.5000030
- American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin. (y.y.). 13 Nisan 2022 tarihinde <https://www.cancer.org/adresinden-erişildi>.
- Anand, R., Dhingra, C., Prasad, S. ve Menon, I. (2014). Betel nut chewing and its deleterious effects on oral cavity. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(3), 499–505. doi:10.4103/0973-1482.137958
- Arantes, L. M. R. B., De Carvalho, A. C., Melendez, M. E., Carvalho, A. L. ve Goloni-Bertollo, E. M. (2014). Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncology*, 50(6), 587–592. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2014.02.015
- Arayataweegool, A., Srisuttee, R., Mahattanasakul, P., Tangjaturonsasme, N., Kerekhanjanarong, V., Kitkumthorn, N. ve Mutirangura, A. (2019). Head and neck squamous cell carcinoma drives long interspersed element-1 hypomethylation in the peripheral blood mononuclear cells. *Oral Diseases*, 25(1), 64–72. doi:10.1111/ODI.12944
- Arya, S., Chaukar, D. ve Pai, P. (2012). Imaging in oral cancers. *Indian Journal of Radiology and Imaging*, 22(3), 195–208. doi:10.4103/0971-3026.107182/BIB
- Bahadur, S. ve Iyer, S. (2021). *Management of Oral Cancers*.
- Bakhtiar, S. M., Ali, A. ve Barh, D. (2015). Epigenetics in Head and Neck Cancer. *Methods in Molecular Biology*, 1238, 751–769. doi:10.1007/978-1-4939-1804-1_39
- Bánóczy, J., Gintner, Z. ve Dombi, C. (2001). Tobacco Use and Oral Leukoplakia. *Journal of Dental Education*, 65(4), 322–327. doi:10.1002/J.0022-0337.2001.65.4.TB03402.X
- Barnes, L. ve Johnson, J. T. (1986). Pathologic and clinical considerations in the

- evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part I. *Pathology annual*, 21 Pt 1, 173–250.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. ve Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences*, 9(3), 193–199. doi:10.7150/IJMS.3635
- Bewley, A. F. ve Farwell, D. G. (2017). Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. *Clinics in dermatology*, 35(5), 461–467. doi:10.1016/J.CLINDERMATOL.2017.06.008
- Bhat, S., Kabekkodu, S. P., Jayaprakash, C., Radhakrishnan, R., Ray, S. ve Satyamoorthy, K. (2017). Gene promoter-associated CpG island hypermethylation in squamous cell carcinoma of the tongue. *Virchows Archiv*, 470(4), 445–454. doi:10.1007/S00428-017-2094-2/FIGURES/7
- "Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E. ve Ferlay, J. (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International journal of cancer*, 132(5), 1133–1145. doi:10.1002/IJC.27711"
- "Brennan, P. A., Bradley, K. L. ve Brands, M. (2017). Intensity-modulated radiotherapy in head and neck cancer — an update for oral and maxillofacial surgeons. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 55(8), 770–774. doi:10.1016/J.BJOMS.2017.07.019"
- "Cai, F., Xiao, X., Niu, X., Shi, H. ve Zhong, Y. (2016). Aberrant Methylation of MGMT Promoter in HNSCC: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 11(9), e0163534. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0163534"
- "Cai, F., Xiao, X., Niu, X. ve Zhong, Y. (2017). Association between promoter methylation of DAPK gene and HNSCC: A meta-analysis. *PLOS ONE*, 12(3), e0173194. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0173194"
- "Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., ... Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*, 56(11), 2488–2492."
- "Calvo, S. E., Compton, A. G., Hershman, S. G., Lim, S. C., Lieber, D. S., Tucker, E. J., ... Mootha, V. K. (2012). Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with

- targeted next-generation sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(118). doi:10.1126/SCITRANSLMED.3003310/SUPPL_FILE/4118RA10_TABLES_S1_S2.ZIP"
- "Cardesa, A., Slootweg, P. J., Gale, N. ve Franchi, A. (2017). Pathology of the head and neck: Second edition. *Pathology of the Head and Neck: Second Edition*, 1–854. doi:10.1007/978-3-662-49672-5"
- "Castilho, R. M., Squarize, C. H. ve Almeida, L. O. (2017). Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1506, 18(7), 1506. doi:10.3390/IJMS18071506"
- "Chaisaingmongkol, J., Popanda, O., Warta, R., Dyckhoff, G., Herpel, E., Geiselhart, L., ... Schmezer, P. (2012). Epigenetic screen of human DNA repair genes identifies aberrant promoter methylation of NEIL1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2012 31:49, 31(49), 5108–5116. doi:10.1038/onc.2011.660"
- "Chen, A. Y. ve Myers, J. N. (2000). Cancer of the oral cavity. *Current Problems in Surgery*, 37(10), 633–731. doi:10.1016/s0011-3840(00)80004-0"
- "Chen, H. C., Yang, C. M., Cheng, J. T., Tsai, K. W., Fu, T. Y., Liou, H. H., ... Ger, L. P. (2016). Global DNA hypomethylation is associated with the development and poor prognosis of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 45(6), 409–417. doi:10.1111/JOP.12381"
- "Cheung, H. H., Lee, T. L., Rennert, O. M. ve Chan, W. Y. (2009). DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects research. Part C, Embryo Today : Reviews*, 87(4), 335–350. doi:10.1002/BDRC.20163"
- "Chi, A. C., Day, T. A. ve Neville, B. W. (2015). Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(5), 401–421. doi:10.3322/CAAC.21293"
- "Choudhury, J. H. ve Ghosh, S. K. (2015). Promoter Hypermethylation Profiling Identifies Subtypes of Head and Neck Cancer with Distinct Viral, Environmental, Genetic and Survival Characteristics. *PLOS ONE*, 10(6), e0129808. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0129808"

- "Chung, I. C., Chen, L. C., Tsang, N. M., Chuang, W. Y., Liao, T. C., Yuan, S. N., ... Chang, Y. S. (2020). Mitochondrial oxidative phosphorylation complex regulates NLRP3 inflammasome activation and predicts patient survival in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular and Cellular Proteomics*, 19(1), 142–154. doi:10.1074/mcp.RA119.001808"
- "Czerninski, R., Zini, A. ve Sgan-Cohen, H. D. (2010). Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. *The British journal of dermatology*, 162(5), 1103–1109. doi:10.1111/J.1365-2133.2010.09698.X"
- "de Santana Sarmiento, D. J., da Costa Miguel, M. C., Queiroz, L. M. G., Godoy, G. P. ve Da Silveira, É. J. D. (2014). Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. *International journal of dermatology*, 53(4), 466–472. doi:10.1111/IJD.12332"
- "Degen, M., Barron, P., Natarajan, E., Widlund, H. R. ve Rheinwald, J. G. (2013). RSK Activation of Translation Factor eIF4B Drives Abnormal Increases of Laminin γ 2 and MYC Protein during Neoplastic Progression to Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE*, 8(10), e78979. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0078979"
- "Dietrich, T., Reichart, P. A. ve Scheifele, C. (2004). Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral oncology*, 40(2), 158–163. doi:10.1016/S1368-8375(03)00145-3"
- "Domingos, P. L. B., Souza, M. G., Guimarães, T. A., Santos, E. S., Farias, L. C., de Carvalho Fraga, C. A., ... Guimarães, A. L. S. (2017). Hypoxia reduces the E-cadherin expression and increases OSCC cell migration regardless of the E-cadherin methylation profile. *Pathology - Research and Practice*, 213(5), 496–501. doi:10.1016/J.PRP.2017.02.003"
- "Don, K. R., Ramani, P., Ramshankar, V., Sherlin, H. J., Premkumar, P. ve Natesan, A. (2014). Promoter hypermethylation patterns of P16, DAPK and MGMT in Oral Squamous Cell Carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Indian Journal of Dental Research*, 25(6), 797. doi:10.4103/0970-9290.152208"
- "Donninger, H., Vos, M. D. ve Clark, G. J. (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of Cell Science*, 120(18), 3163–3172. doi:10.1242/JCS.010389"
- "Dost, F., Do, L. ve Farah, C. S. (2016). Lesion Evaluation, Screening and Identification of

- Oral Neoplasia Study: an assessment of high-risk Australian populations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 44(1), 64–75. doi:10.1111/CDOE.12191"
- "Duan, S. M., Liu, T. N. ve Zeng, X. (2020). Research progress of oral erythroplakia. *Chinese Journal of Stomatology*, 55(06), 421–424. doi:10.3760/CMA.J.CN112144-20190923-00360"
- "Dufresne, R. G. ve Curlin, M. U. (1997). Actinic cheilitis: A treatment review. *Dermatologic Surgery*, 23(1), 15–21. doi:10.1111/J.1524-4725.1997.TB00002.X"
- "Dvojakovska, S., Popovic-Monevska, D., Grcev, A., Pancevski, G., Benedetti, A., Popovski, V., ... Stamatovski, A. (2018). Promotor hypermethylated genes: Prospective diagnostic biomarkers in oral cancerogenesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(10), 1737–1740. doi:10.1016/J.JCMS.2018.07.019"
- "Edition, S., Edge, S. B. ve Byrd, D. R. (2018). AJCC cancer staging manual. *AJCC cancer staging manual*."
- "Ehrlich, M. (2009a). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239–259. doi:10.2217/EPI.09.33/ASSET/IMAGES/LARGE/GRAPHIC35.JPEG"
- "Ehrlich, M. (2009b). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239–259. doi:10.2217/EPI.09.33"
- "Ellington, T. D., Henley, S. J., Senkomago, V., O'Neil, M. E., Wilson, R. J., Singh, S., ... Richardson, L. C. (2020). Trends in Incidence of Cancers of the Oral Cavity and Pharynx — United States 2007–2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(15), 433–438. doi:10.15585/MMWR.MM6915A1"
- "Ettinger, K. S., Ganry, L. ve Fernandes, R. P. (2019). Oral Cavity Cancer. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 31(1), 13–29. doi:10.1016/J.COMS.2018.08.002"
- "Fan, C. Y. (2004). Epigenetic alterations in head and neck cancer: Prevalence, clinical significance, and implications. *Current Oncology Reports 2004* 6:2, 6(2), 152–161. doi:10.1007/S11912-004-0027-0"
- "Feinberg, A. P. ve Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 143–153. doi:10.1038/nrc1279"
- "Field, J. K. (1995). The role of oncogenes and tumour-suppressor genes in the aetiology

- of oral, head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88(1), 35P. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1295074/> adresinden erişildi."
- "Foy, J. P., Pickering, C. R., Papadimitrakopoulou, V. A., Jelinek, J., Lin, S. H., William, W. N., ... Saintigny, P. (2015). New DNA methylation markers and global DNA hypomethylation are associated with oral cancer development. *Cancer Prevention Research*, 8(11), 1027–1035. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-14-0179/36367/AM/NEW-DNA-METHYLATION-MARKERS-AND-GLOBAL-DNA"
- "Funk, G. F., Karnell, L. H., Robinson, R. A., Zhen, W. K., Trask, D. K. ve Hoffman, H. T. (2002). Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: A national cancer data base report. *Head & Neck*, 24(2), 165–180. doi:10.1002/HED.10004"
- "Furlan, C., Polesel, J., Barzan, L., Franchin, G., Sulfaro, S., Romeo, S., ... Fratta, E. (2017). Prognostic significance of LINE-1 hypomethylation in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical Epigenetics*, 9(1), 1–11. doi:10.1186/S13148-017-0357-Z/FIGURES/4"
- "Garnis, C., Campbell, J., Zhang, L., Rosin, M. P. ve Lam, W. L. (2004). OCGR array: an oral cancer genomic regional array for comparative genomic hybridization analysis. *Oral oncology*, 40(5), 511–519. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2003.10.006"
- "Genden, E. M., Ferlito, A., Shaha, A. R. ve Rinaldo, A. (2003). Management of cancer of the retromolar trigone. *Oral Oncology*, 39(7), 633–637. doi:10.1016/S1368-8375(03)00103-9"
- "Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., ... Sidransky, D. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9), 709–720. doi:10.1093/JNCI/92.9.709"
- "Gonsalves, W. C., Chi, A. C. ve Neville, B. W. (2007). Common Oral Lesions: Part I. Superficial Mucosal Lesions. <http://family-doctor.org/613.xml>. adresinden erişildi."
- "Gopisetty, G., Ramachandran, K. ve Singal, R. (2006). DNA methylation and apoptosis. *Molecular Immunology*, 43(11), 1729–1740. doi:10.1016/J.MOLIMM.2005.11.010"
- "Greer, R. O. (2006). Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions.

- Otolaryngologic clinics of North America*, 39(2), 249–275. doi:10.1016/J.OTC.2005.11.002"
- "Guha, N., Warnakulasuriya, S., Vlaanderen, J. ve Straif, K. (2014). Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: a meta-analysis with implications for cancer control. *International journal of cancer*, 135(6), 1433–1443. doi:10.1002/IJC.28643"
- "Guillaud, M., Zhang, L., Poh, C., Rosin, M. P. ve MacAulay, C. (2008). Potential use of quantitative tissue phenotype to predict malignant risk for oral premalignant lesions. *Cancer Research*, 68(9), 3099–3107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2113"
- "Guo, T. ve Califano, J. A. (2015). Molecular Biology and Immunology of Head and Neck Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 24(3), 397–407. doi:10.1016/J.SOC.2015.03.002"
- "Gupta, P. C. ve Warnakulasuriya, S. (2002). Global epidemiology of areca nut usage. *Addiction Biology*, 7(1), 77–83. doi:10.1080/13556210020091437"
- "Gupta, S., Shah, J., Parikh, S., Limbdiwala, P. ve Goel, S. (2014). Clinical correlative study on early detection of oral cancer and precancerous lesions by modified oral brush biopsy and cytology followed by histopathology. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(2), 232. doi:10.4103/0973-1482.136539"
- "Haim, S. (1981). Oral leukoplakia. *Harefuah*, 101(1–2), 35–37."
- "Hakim, A., Zhang, X., DeLisle, A., Oral, E. A., Dykas, D., Drzewiecki, K., ... Vilarinho, S. (2019). Clinical utility of genomic analysis in adults with idiopathic liver disease. *Journal of Hepatology*, 70(6), 1214–1221. doi:10.1016/J.JHEP.2019.01.036"
- "Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New DimensionsHallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059"
- "Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013"
- "Hashibe, M., Sankaranarayanan, R., Thomas, G., Kuruvilla, B., Mathew, B., Somanathan, T., ... Zhang, Z. F. (2002). Body mass index, tobacco chewing, alcohol drinking and the risk of oral submucous fibrosis in Kerala, India. *Cancer Causes & Control* 2002 13:1, 13(1), 55–64. doi:10.1023/A:1013991025848"

- "Hatziapostolou, M. ve Iliopoulos, D. (2011). Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011 68:10, 68(10), 1681–1702. doi:10.1007/S00018-010-0624-Z"
- "Howard, A., Agrawal, N. ve Gooi, Z. (2021). Lip and Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 35(5), 895–911. doi:10.1016/j.hoc.2021.05.003"
- "IARC. (2004). WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 83 Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *Tobacco Smoke & Involuntary Smoking*, 83, Volume 83."
- "Ismail, S. B., Kumar, S. K. S. ve Zain, R. B. (2007). Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *Journal of oral science*, 49(2), 89–106. doi:10.2334/josnusd.49.89"
- "Jacobs, C. D., Moravan, M. J., Choe, J., Kahmke, R., Mowery, Y. ve Salama, J. K. (2018). *Oral cavity cancer: Diagnosis and treatment. Encyclopedia of Cancer* (3. bs.). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.65316-3"
- "Jayalekshmi, P. A., Gangadharan, P., Akiba, S., Nair, R. R. K., Tsuji, M. ve Rajan, B. (2009). Tobacco chewing and female oral cavity cancer risk in Karunagappally cohort, India. *British Journal of Cancer*, 100(5), 848. doi:10.1038/SJ.BJC.6604907"
- "Jeyanthi, V., Probert, C. S., Sher, K. S. ve Mayberry, J. F. (1992). Oral submucosal fibrosis--a preventable disease. *Gut*, 33(1), 4–6. doi:10.1136/GUT.33.1.4"
- "Johnson, D. E., Burtneess, B., Leemans, C. R., Lui, V. W. Y., Bauman, J. E. ve Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1, 6(1), 1–22. doi:10.1038/s41572-020-00224-3"
- "Jones, P. A. ve Laird, P. W. (1999). Cancer-epigenetics comes of age. *Nature Genetics* 1999 21:2, 21(2), 163–167. doi:10.1038/5947"
- "Jurel, S. K., Gupta, D. S., Singh, R. D., Singh, M. ve Srivastava, S. (2014). Genes and oral cancer. *Indian journal of human genetics*, 20(1), 4–9. doi:10.4103/0971-6866.132745"
- "Kalavrezos, N. ve Bhandari, R. (2010). Current trends and future perspectives in the

- surgical management of oral cancer. *Oral Oncology*, 46(6), 429–432. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2010.03.007"
- "Kanwal, R., Gupta, K. ve Gupta, S. (2015). Cancer epigenetics: an introduction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1238, 3–25. doi:10.1007/978-1-4939-1804-1_1"
- "Kao, Y. H., Chen, C. N., Chiang, J. K., Chen, S. S. ve Huang, W. W. (2009). Predicting factors in the last week of survival in elderly patients with terminal cancer: a prospective study in southern Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 108(3), 231–239. doi:10.1016/S0929-6646(09)60057-7"
- "Katz, R. W., Brahim, J. S. ve Travis, W. D. (1990). Oral squamous cell carcinoma arising in a patient with long-standing lichen planus: A case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 70(3), 282–285. doi:10.1016/0030-4220(90)90141-E"
- "Kerawala, C., Roques, T., Jeannon, J. P. ve Bisase, B. (2016). Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *The Journal of Laryngology & Otology*, 130(S2), S83–S89. doi:10.1017/S0022215116000499"
- "Kerbel, R. S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*, 21(3), 505–515. doi:10.1093/CARCIN/21.3.505"
- "Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., ... Kirn, D. H. (2000). a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature medicine*, 6(8), 879–885. doi:10.1038/78638"
- "Kitkumthorn, N., Keelawat, S., Rattanatanyong, P. ve Mutirangura, A. (2012). LINE-1 and Alu Methylation Patterns in Lymph Node Metastases of Head and Neck Cancers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(9), 4469–4475. doi:10.7314/APJCP.2012.13.9.4469"
- "Kitkumthorn, N. ve Mutirangura, A. (2011). Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clinical Epigenetics*, 2(2), 315. doi:10.1007/S13148-011-0032-8"
- "Kossatz, S., Brand, C., Gutiontov, S., Liu, J. T. C., Lee, N. Y., Gönen, M., ... Reiner, T. (2016). Detection and delineation of oral cancer with a PARP1 targeted optical imaging agent OPEN. doi:10.1038/srep21371"

- "Koutsimpelas, D., Pongsapich, W., Heinrich, U., Mann, S., Mann, W. J. ve Brieger, J. (2012). Promoter methylation of MGMT, MLH1 and RASSF1A tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncology Reports*, 27(4), 1135–1141. doi:10.3892/OR.2012.1624/HTML"
- "Kruk-zagajewska, A. (2003). Rak języka i dna jamy ustnej – rozpoznawanie i postępy w leczeniu, 4."
- "Kujan, O., Oliver, R., Roz, L., Sozzi, G., Ribeiro, N., Woodward, R., ... Sloan, P. (2006). Fragile histidine triad expression in oral squamous cell carcinoma and precursor lesions. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(22), 6723–6729. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1475"
- "Kumar, M., Singh, M. ve Suwasini, S. (2021). Epidemiological and clinicopathological analysis of oral leukoplakia in Patna. *Indian Journal of Dental Sciences*, 13(1), 12. doi:10.4103/IJDS.IJDS_26_20"
- "Kurasawa, Y., Shiiba, M., Nakamura, M., Fushimi, K., Ishigami, T., Bukawa, H., ... Tanzawa, H. (2008). PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 19(6), 1429–1434. doi:10.3892/OR.19.6.1429"
- "Lacy, M. F., Reade, P. C. ve Hay, K. D. (1983). Lichen planus: A theory of pathogenesis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 56(5), 521–526. doi:10.1016/0030-4220(83)90100-7"
- "Law, C. P., Chandra, R. V., Hoang, J. K. ve Phal, P. (2011). Imaging the oral cavity: key concepts for the radiologist. *The British Journal of Radiology*, 84(1006), 944. doi:10.1259/BJR/70520972"
- "Lee, J., Seol, M. Y., Jeong, S., Lee, C. R., Ku, C. R., Kang, S. W., ... Jo, Y. S. (2015). A metabolic phenotype based on mitochondrial ribosomal protein expression as a predictor of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Medicine (United States)*, 94(2), e380. doi:10.1097/MD.0000000000000380"
- "Lemaire, F., Millon, R., Young, J., Cromer, A., Wasylyk, C., Schultz, I., ... Wasylyk, B. (2003). Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *British Journal of Cancer* 2003 89:10, 89(10), 1940–1949.

doi:10.1038/sj.bjc.6601373"

- "Li, Jinbang, Gong, P., Lyu, X., Yao, K., Li, X. ve Peng, H. (2014). Aberrant CpG island methylation of PTEN is an early event in nasopharyngeal carcinoma and a potential diagnostic biomarker. *Oncology Reports*, 31(5), 2206–2212. doi:10.3892/OR.2014.3061/HTML"
- "Li, Jinhui, Huang, Q., Zeng, F., Li, W., He, Z., Chen, W., ... Zhang, B. (2014). The Prognostic Value of Global DNA Hypomethylation in Cancer: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 9(9), e106290. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0106290"
- "Li, Y. C., Chang, J. T., Chiu, C., Lu, Y. C., Li, Y. L., Chiang, C. H., ... Cheng, A. J. (2016). Areca nut contributes to oral malignancy through facilitating the conversion of cancer stem cells. *Molecular carcinogenesis*, 55(5), 1012–1023. doi:10.1002/MC.22344"
- "Liu, C., Li, M., Dong, Z. X., Jiang, D., Li, X., Lin, S., ... Luker, G. D. (2021). Heterogeneous microenvironmental stiffness regulates pro-metastatic functions of breast cancer cells. *Acta Biomaterialia*, 131, 326–340. doi:10.1016/j.actbio.2021.07.009"
- "Luczak, M. W. ve Jagodziński, P. P. (2006). The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(3), 143–154. https://journals.viamedica.pl/folia_histochemica_cytobiologica/article/view/4561 adresinden erişildi."
- "Lydiatt, W. M., Patel, S. G., O'Sullivan, B., Brandwein, M. S., Ridge, J. A., Migliacci, J. C., ... Shah, J. P. (2017). Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(2), 122–137. doi:10.3322/CAAC.21389"
- "Magić, Z., Supić, G., Branković-Magić, M. ve Jovic, N. (2012). DNA Methylation in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer. *Methylation - From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*. doi:10.5772/51169"
- "Maymone, M. B. C., Greer, R. O., Burdine, L. K., Dao-Cheng, A., Venkatesh, S., Sahitya, P. C., ... Vashi, N. A. (2019). Benign oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(1), 43–56. doi:10.1016/j.jaad.2018.09.061"

- "Maymone, M. B. C., Greer, R. O., Kesecker, J., Sahitya, P. C., Burdine, L. K., Cheng, A. D., ... Vashi, N. A. (2019). Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 81(1), 59–71. doi:10.1016/J.JAAD.2018.09.060"
- "Mazziotti, S., Pandolfo, I., D'Angelo, T., Mileto, A., Visalli, C., Racchiusa, S., ... Ascenti, G. (2014). Diagnostic Approach to Retromolar Trigone Cancer by Multiplanar Computed Tomography Reconstructions. *Canadian Association of Radiologists Journal*, 65(4), 335–344. doi:10.1016/J.CARJ.2014.04.001"
- "Mehanna, H., Paleri, V., West, C. M. L. ve Nutting, C. (2010). Head and neck cancer - Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ (Online)*, 341(7774), 663–666. doi:10.1136/bmj.c4684"
- "Mehrotra, R. ve Gupta, D. K. (2011). Exciting new advances in oral cancer diagnosis: Avenues to early detection. *Head and Neck Oncology*, 3(1), 1–9. doi:10.1186/1758-3284-3-33/FIGURES/1"
- "Mello, F. W., Miguel, A. F. P., Dutra, K. L., Porporatti, A. L., Warnakulasuriya, S., Guerra, E. N. S. ve Rivero, E. R. C. (2018). Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 47(7), 633–640. doi:10.1111/JOP.12726"
- "Mendenhall, W. M., Morris, C. G., Amdur, R. J., Hinerman, R. W., Malyapa, R. S., Werning, J. W., ... Villaret, D. B. (2006). Definitive radiotherapy for tonsillar squamous cell carcinoma. *American journal of clinical oncology*, 29(3), 290–297. doi:10.1097/01.COC.0000209510.19360.F9"
- "Meng, R. W., Li, Y. C., Chen, X., Huang, Y. X., Shi, H., Du, D. D., ... Lu, M. X. (2016). Aberrant Methylation of RASSF1A Closely Associated with HNSCC, a Meta-Analysis. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–8. doi:10.1038/srep20756"
- "Mishra, N. (2019). Pigmented Lesion of Oral Cavity. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(11)."
- "Modrich, P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *The Journal of biological chemistry*, 281(41), 30305–30309. doi:10.1074/JBC.R600022200"

- "Mohan, M. ve Jagannathan, N. (2014). Oral Field Cancerization: An Update on Current Concepts. *Oncology Reviews*, 8(1), 13–19. doi:10.4081/ONCOL.2014.244"
- "Momparker, R. L. (2003). Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003 22:42, 22(42), 6479–6483. doi:10.1038/sj.onc.1206774"
- "Morandi, L., Gissi, D., Tarsitano, A., Asioli, S., Gabusi, A., Marchetti, C., ... Foschini, M. P. (2017). CpG location and methylation level are crucial factors for the early detection of oral squamous cell carcinoma in brushing samples using bisulfite sequencing of a 13-gene panel. *Clinical Epigenetics*, 9(1), 1–17. doi:10.1186/S13148-017-0386-7/FIGURES/8"
- "Mustafa, E., Praveen, P. ve Lesions, P. (2021). Premalignant Lesions and Conditions of the Oral Cavity. *Oral and Maxillofacial Surgery for the Clinician*, 1845–1852. doi:10.1007/978-981-15-1346-6_80"
- "Nair, U., Bartsch, H. ve Nair, J. (2004). Alert for an epidemic of oral cancer due to use of the betel quid substitutes gutkha and pan masala: a review of agents and causative mechanisms. *Mutagenesis*, 19(4), 251–262. doi:10.1093/MUTAGE/GEH036"
- "National Cancer Institute. (2021). Lip and Oral Cavity Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Patient Version. *PDQ Cancer Information Summaries*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389326> adresinden erişildi."
- "National Center for Biotechnology Information. (2022). Complex I Biogenesis. 27 Nisan 2022 tarihinde <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/pathway/Reactome:R-HSA-6799198> adresinden erişildi."
- "Nawroz, H., van der Riet, P., Hruban, R. H., Koch, W., Ruppert, J. M. ve Sidransky, D. (1994). Allelotype of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*, 54(5), 1152–1155."
- "Nishi, H., Shinozaki, T., Tomioka, T., Maruo, T. ve Hayashi, R. (2018). Squamous cell carcinoma of the retromolar trigone: Treatment outcomes. *Auris Nasus Larynx*, 45(2), 337–342. doi:10.1016/J.AN.L.2017.05.011"
- "Nocini, R., Lippi, G. ve Mattiuzzi, C. (2020). Biological and epidemiologic updates on lip and oral cavity cancers. *Annals of Cancer Epidemiology*, 4(0), 1–1. doi:10.21037/ACE.2020.01.01"

- "Olson, M. A., Rogers, R. S. ve Bruce, A. J. (2016). Oral lichen planus. *Clinics in Dermatology*, 34(4), 495–504. doi:10.1016/J.CLINDERMATOL.2016.02.023"
- "Onerci Celebi, O., Tezel, G. G., Hosal, A. S., Cengiz, M., Gullu, I. H. ve Hayran, M. (2016). Detection of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter region methylation pattern using pyrosequencing and the effect of methylation pattern on survival, recurrence, and chemotherapy sensitivity in patients with laryngeal cancer. *Pathology - Research and Practice*, 212(5), 456–462. doi:10.1016/J.PRP.2016.02.022"
- "Osorio, J. C. ve Castillo, A. (2016). Epigenetic Mechanisms in Head and Neck Cancer. *New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis*. doi:10.5772/61135"
- "Padhi, S. S., Roy, S. S., Kar, M., Saha, A., Roy, S. S., Adhya, A., ... Banerjee, B. (2017). Role of CDKN2A/p16 expression in the prognostication of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 73, 27–35. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2017.07.030"
- "Pannone, G., Santoro, A., Feola, A., Bufo, P., Papagerakis, P., Muzio, L., ... Domenico, M. (2014). The Role of E-Cadherin Down-Regulation in Oral Cancer: CDH1 Gene Expression and Epigenetic Blockage. *Current Cancer Drug Targets*, 14(2), 115–127. doi:10.2174/1568009613666131126115012"
- "Papke, R. L., Horenstein, N. A. ve Stokes, C. (2015). Nicotinic activity of arecoline, the psychoactive element of “betel nuts”, suggests a basis for habitual use and anti-inflammatory activity. *PLoS ONE*, 10(10), 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0140907"
- "Park, Y. J., Claus, R., Weichenhan, D. ve Plass, C. (2011). Genome-wide epigenetic modifications in cancer. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 67, 25–49. doi:10.1007/978-3-7643-8989-5_2"
- "Petti, S. (2003). Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral oncology*, 39(8), 770–780. doi:10.1016/S1368-8375(03)00102-7"
- "Pindborg, J. J., Reichart, P. a., Smith, C. J. ve van der Waal, I. (1997). World Health Organization: Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. Second Edition. *Springer-Verlag*, 2."

- "Prisman, E., Miles, B. A. ve Genden, E. M. (2019). Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery. *Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery*. doi:10.1007/978-1-4939-1529-3"
- "Puttipanyalears, C., Subbalekha, K., Mutirangura, A. ve Kitkumthorn, N. (2013). Alu Hypomethylation in Smoke-Exposed Epithelia and Oral Squamous Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(9), 5495–5501. doi:10.7314/APJCP.2013.14.9.5495"
- "Qin, G.-Z., Park, J. Y., Chen, S.-Y. ve Lazarus, P. (1999). A HIGH PREVALENCE OF p53 MUTATIONS IN PRE-MALIGNANT ORAL ERYTHROPLAKIA. *J. Cancer*, 80, 345–348. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990129)80:3"
- "Regezi, J., Sciubba, J. ve Jordan, R. (2016). Oral pathology: clinical pathologic correlations. <https://books.google.com/books?hl=tr&lr=&id=Lj3dCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=Eu97IV8Q0e&sig=cUXVYIYX3MIKE1eaHI5562UFOb0> adresinden erişildi."
- "Reichart, P. A. ve Philipsen, H. P. (2005). Oral erythroplakia--a review. *Oral oncology*, 41(6), 551–561. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2004.12.003"
- "Rethman, M. P., Carpenter, W., Cohen, E. E. W., Epstein, J., Evans, C. A., Flalfz, C. M., ... Meyer, D. M. (2010). Evidence-Based Clinical Recommendations Regarding Screening for Oral Squamous Cell Carcinomas. *The Journal of the American Dental Association*, 141(5), 509–520. doi:10.14219/JADA.ARCHIVE.2010.0223"
- "Reyngold, M. ve Chan, T. A. (2013). DNA methylation. *Molecular Oncology: Causes of Cancer and Targets for Treatment*, 37–45. doi:10.1017/CBO9781139046947.006"
- "Richards, K. L., Zhang, B., Baggerly, K. A., Colella, S., Lang, J. C., Schuller, D. E. ve Krahe, R. (2009). Genome-Wide Hypomethylation in Head and Neck Cancer Is More Pronounced in HPV-Negative Tumors and Is Associated with Genomic Instability. *PLOS ONE*, 4(3), e4941. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0004941"
- "Rivera, C. (2015). Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(9), 11884–11894."
- "Rogers, S. N. (2010). Quality of life perspectives in patients with oral cancer. *Oral Oncology*, 46(6), 445–447. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2010.02.021"

- "Rumboldt, Z., Gordon, L., Gordon, L., Bonsall, R. ve Ackermann, S. (2006). Imaging in head and neck cancer. *Current treatment options in oncology*, 7(1), 23–34. doi:10.1007/s11864-006-0029-2"
- "Rusthoven, K., Ballonoff, A., Raben, D. ve Chen, C. (2008). Poor prognosis in patients with stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer*, 112(2), 345–351. doi:10.1002/CNCR.23183"
- "Sanchez-Cespedes, M., Esteller, M., Wu, L., Nawroz-Danish, H., Yoo, G. H., Koch, W. M., ... Sidransky, D. (2000). Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer research*, 60(4), 892–895."
- "Sarode, G., Maniyar, N., Sarode, S. C., Jafer, M., Patil, S. ve Awan, K. H. (2020). Epidemiologic aspects of oral cancer. *Disease-a-month : DM*, 66(12). doi:10.1016/J.DISAMONTH.2020.100988"
- "Schwartz, R. A., Bridges, T. M., Butani, A. K. ve Ehrlich, A. (2008). Actinic keratosis: an occupational and environmental disorder. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(5), 606–615. doi:10.1111/J.1468-3083.2008.02579.X"
- "Sciubba, J. J. (1995). Oral leukoplakia. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 6(2), 147–160. doi:10.1177/10454411950060020401"
- "Scully, C. ve Bagan, J. V. (2008). Recent advances in Oral Oncology 2007: Imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncology*, 44(3), 211–215. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.01.006"
- "Shah, J. P. ve Gil, Z. (2009). Current concepts in management of oral cancer – Surgery. *Oral Oncology*, 45(4–5), 394–401. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.05.017"
- "Sharma, A. K., Anil Kumar, S., Indu, S., Gautami, D. ve Varruchi, S. (2020). Oral squamous cell carcinoma (OSCC) in humans: Etiological Factors, diagnostic and therapeutic relevance. *Article in Research Journal of Biotechnology*, 15(10). <https://www.researchgate.net/publication/344374174> adresinden erişildi."
- "Shaw, R. J., McGlashan, G., Woolgar, J. A., Lowe, D., Brown, J. S., Vaughan, E. D. ve Rogers, S. N. (2009). Prognostic importance of site in squamous cell carcinoma of the

- buccal mucosa. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*, 47(5), 356–359. doi:10.1016/J.BJOMS.2008.09.017"
- "Shetty, S. S., Kudpaje, A., Jayaraj, R., Rao, V. ve Shah, P. K. (2019). Tongue cancer: A discrete oral cavity subsite. *Oral Oncology*, 99(July), 104348. doi:10.1016/j.oraloncology.2019.06.029"
- "Shpitzer, T., Hamzany, Y., Bahar, G., Feinmesser, R., Savulescu, D., Borovoi, I., ... Nagler, R. M. (2009). Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *British journal of cancer*, 101(7), 1194–1198. doi:10.1038/SJ.BJC.6605290"
- "Silverman, S., Gorsky, M. ve Lozada-Nur, F. (1985). A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: Persistence, remission, and malignant association. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 60(1), 30–34. doi:10.1016/0030-4220(85)90210-5"
- "Silverman, S. J., Gorsky, M. ve Lozada, F. (1984). Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*, 53(3), 563–568. doi:10.1002/1097-0142(19840201)53:3<563::aid-cnrcr2820530332>3.0.co;2-f"
- "Slaughter, D. P., Southwick, H. W. ve Smejkal, W. (1953). "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963–968. doi:10.1002/1097-0142"
- "Slootweg, P. J. ve Richardson, M. (2009). Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aerodigestive System. *Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck*, 45–110. doi:10.1016/B978-1-4160-2589-4.00002-4"
- "Smith, I. M., Mydlarz, W. K., Mithani, S. K. ve Califano, J. A. (2007). DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *International Journal of Cancer*, 121(8), 1724–1728. doi:10.1002/ijc.22889"
- "Som, P. M., Smoker, W. R. K., Curtin, H. D., Reidenberg, J. S. ve Laitman, J. (2011). Congenital lesions of the neck. *Head and neck imaging. 5th ed. St. Louis, MO: Mosby*, 2235–2286."
- "Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A. ve Smith, S. R. (2005). A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for

- Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle. *Diabetes*, 54(7), 1926–1933. doi:10.2337/DIABETES.54.7.1926"
- "Strzelczyk, J. K., Krakowczyk, L. ve Owczarek, A. J. (2018). Aberrant DNA methylation of the p16, APC, MGMT, TIMP3 and CDH1 gene promoters in tumours and the surgical margins of patients with oral cavity cancer. *Journal of Cancer*, 9(11), 1896–1904. doi:10.7150/JCA.24477"
- "Strzelczyk, J. K., Krakowczyk, Ł. ve Owczarek, A. J. (2019). Methylation status of SFRP1, SFRP2, RASSF1A, RAR β and DAPK1 genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Archives of Oral Biology*, 98, 265–272. doi:10.1016/J.ARCHORALBIO.2018.12.001"
- "Subbalekha, K., Pimkhaokham, A., Pavasant, P., Chindavijak, S., Phokaew, C., Shuangshoti, S., ... Mutirangura, A. (2009). Detection of LINE-1s hypomethylation in oral rinses of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology*, 45(2), 184–191. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.05.002"
- "Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. doi:10.3322/CAAC.21660"
- "Sushma, P. S., Jamil, K., Kumar, P. U., Satyanarayana, U., Ramakrishna, M. ve Triveni, B. (2016). PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. *Tumor Biology*, 37(6), 7625–7632. doi:10.1007/S13277-015-4648-8/FIGURES/4"
- "Swain, S. K. (2021). Premalignant lesions of the oral cavity: current perspectives. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 9(6), 1816. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20212259"
- "Swain, S. K. ve Debta, P. (2020a). Nonsurgical treatment of oral cavity leukoplakia. *Matrix Science Medica*, 4(4), 91. doi:10.4103/MTSM.MTSM_22_20"
- "Swain, S. K. ve Debta, P. (2020b). Aspergillosis of the palatine tonsil. *Annals of Indian Academy of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*, 4(2), 50. doi:10.4103/AIAO.AIAO_27_19"

- "Swain, S. K., Nahak, B. ve Sahu, M. C. (2017). Fungal laryngitis in asthmatic boy treated with inhalatory corticosteroids: A case report. *Pediatrics Polska*, 92(4), 453–456. doi:10.1016/J.PEPO.2017.03.017"
- "Swain, S. K., Sahoo, L. ve Panda, S. (2020). Voice outcome after coblation-assisted microlaryngeal surgery -Our experiences at a tertiary care teaching hospital. *Journal of Laryngology and Voice*, 10(1), 1. doi:10.4103/JLV.JLV_8_20"
- "Tanaka, T. ve Ishigamori, R. (2011). Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *Journal of oncology*, 2011. doi:10.1155/2011/603740"
- "Thavarajah, R. ve Ranganathan, K. (2017). Trends in oral squamous cell carcinoma: Diagnosis for effective, evidence-based treatment 2017. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(2), 189. doi:10.4103/JOMFP.JOMFP_97_17"
- "Thompson, L. D. R. (2003). Squamous cell carcinoma variants of the head and neck. *Current Diagnostic Pathology*, 9(6), 384–396. doi:10.1016/S0968-6053(03)00069-3"
- "Tilakaratne, W. M., Klinikowski, M. F., Saku, T., Peters, T. J. ve Warnakulasuriya, S. (2006). Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis. *Oral oncology*, 42(6), 561–568. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2005.08.005"
- "Todd, R., McBride, J., Tsujl, T., Donoff, R. B., Nagai, M., Chou, M. Y., ... Wong, D. T. W. (1995). Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. *The FASEB Journal*, 9(13), 1362–1370. doi:10.1096/FASEBJ.9.13.7557027"
- "Tran, M., Leflein, S. A., Gonzalez, M. E. ve Kleer, C. G. (2021). The matricellular protein CCN6 differentially regulates mitochondrial metabolism in normal epithelium and in metaplastic breast carcinomas. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 16(3), 433–445. doi:10.1007/s12079-021-00657-9"
- "Van Der Waal, I., Schepman, K. P., Van Der Meij, E. H. ve Smeele, L. E. (1997). Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral oncology*, 33(5), 291–301. doi:10.1016/S1368-8375(97)00002-X"
- "van der Waal, Isaäc. (2009). Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral oncology*, 45(4–5), 317–323. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.05.016"
- "Van Noesel, M. M., Van Bezouw, S., Voûte, P. A., Herman, J. G., Pieters, R. ve Versteeg,

- R. (2003). Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes and Cancer*, 38(3), 226–233. doi:10.1002/gcc.10278"
- "Veeramachaneni, R., Walker, T., Revil, T., Weck, A. De, Badescu, D., O'Sullivan, J., ... Thakker, N. (2019). Analysis of head and neck carcinoma progression reveals novel and relevant stage-specific changes associated with immortalisation and malignancy. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–17. doi:10.1038/s41598-019-48229-7"
- "Vigneswaran, N. ve El-Naggar, A. K. (2016). Early Detection and Diagnosis of Oral Premalignant Squamous Mucosal Lesions. *Biomedical Optics in Otorhinolaryngology: Head and Neck Surgery*, 601–617. doi:10.1007/978-1-4939-1758-7_37"
- "Vyhnalova, T., Danek, Z., Gachova, D. ve Linhartova, P. B. (2021). The Role of the Oral Microbiota in the Etiopathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Microorganisms*, 9(8). doi:10.3390/MICROORGANISMS9081549"
- "Walker, D. M., Boey, G. ve McDonald, L. A. (2003). The pathology of oral cancer. *Pathology*, 35(5), 376–383. doi:10.1080/00310290310001602558"
- "Warnakulasuriya, S., Johnson, N. W. ve Van Der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 36(10), 575–580. doi:10.1111/J.1600-0714.2007.00582.X"
- "Warnakulasuriya, Saman. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*, 45(4–5), 309–316. doi:10.1016/J.ORALONCOLOGY.2008.06.002"
- "Wen, C. P., Tsai, M. K., Chung, W. S. I., Hsu, H. L., Chang, Y. C., Chan, H. T., ... Tsai, S. P. (2010). Cancer risks from betel quid chewing beyond oral cancer: a multiple-site carcinogen when acting with smoking. *Cancer Causes Control.*, Sep;21(9), 1427–35. doi:10.1007/s10552-010-9570-1"
- "Wen, G., Wang, H. ve Zhong, Z. (2018). Associations of RASSF1A, RAR β , and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk. *Medicine (United States)*, 97(11). doi:10.1097/MD.00000000000009971"
- "Wetzel, S. L. ve Wollenberg, J. (2020). Oral Potentially Malignant Disorders. *Dental Clinics of North America*, 64(1), 25–37. doi:10.1016/J.CDEN.2019.08.004"
- "WHO. (2022). World Health Organization. 1 Eylül 2022 tarihinde

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> adresinden erişildi."

- "Woo, S. Bin. (2019). Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. *Head and Neck Pathology*, 13(3), 423–439. doi:10.1007/S12105-019-01020-6"
- "Woodford, D., Johnson, S. D., Costa, A.-M. A. De ve Young, M. R. I. (2014). An Inflammatory Cytokine Milieu is Prominent in Premalignant Oral Lesions, but Subsides when Lesions Progress to Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical & cellular immunology*, 5(3). doi:10.4172/2155-9899.1000230"
- "Wu, J. H., Zhou, Y. ve Luo, X. Y. (2020). [Role of narrow band imaging in the diagnosis of premalignant and malignant lesions of oral cavity]. *Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery*, 55(2), 104–108. doi:10.3760/CMA.J.ISSN.1673-0860.2020.02.005"
- "Yanik, E. L., Katki, H. A., Silverberg, M. J., Manos, M. M., Engels, E. A. ve Chaturvedi, A. K. (2015). Leukoplakia, oral cavity cancer risk, and cancer survival in the U.S. elderly. *Cancer Prevention Research*, 8(9), 857–863. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-15-0091/36111/AM/LEUKOPLAKIA-ORAL-CAVITY-CANCER-RISK-AND-CANCER"
- "Yesuratnam, A., Wiesenfeld, D., Tsui, A., Iseli, T. A., Hoorn, S. V., Ang, M. T., ... Phal, P. M. (2014). Preoperative evaluation of oral tongue squamous cell carcinoma with intraoral ultrasound and magnetic resonance imaging-comparison with histopathological tumour thickness and accuracy in guiding patient management. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 43(7), 787–794. doi:10.1016/J.IJOM.2013.12.009"
- "Yin, X. J., Hong, W., Tian, F. J. ve Li, X. C. (2021). Proteomic analysis of decidua in patients with recurrent pregnancy loss (RPL) reveals mitochondrial oxidative stress dysfunction. *Clinical Proteomics*, 18(1), 1–15. doi:10.1186/S12014-021-09312-2/FIGURES/5"
- "Zhang, J., Shen, Z., Liu, H., Liu, S. ve Shu, W. (2018). Diagnostic potential of methylated *DAPK* in brushing samples of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Management and Research*, 10, 2953–2964. doi:10.2147/CMAR.S171796"
- "Zhou, C., Shen, Z., Ye, D., Li, Q., Deng, H., Liu, H. ve Li, J. (2018). The Association and Clinical Significance of CDKN2A Promoter Methylation in Head and Neck

Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(3), 868–882. doi:10.1159/000494473/)"

"Zhu, J., Zheng, X., Lu, D., Zheng, Y. ve Liu, J. (2022). Clinical Relevance and Tumor Growth Suppression of Mitochondrial ROS Regulators along NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B3 in Thyroid Cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022. doi:10.1155/2022/8038857"



HAM VERILER

FORMLAR



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MITOKONDRIYAL ELEKTRON TRANSPORTUNDA GÖREV ALAN
NDUFB3 GENİNİN ORAL PREMALİN LEZYONLARDA EPIGENETİK
BIYOBELİRTEÇ POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI-2

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 7	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
6	de.unionpedia.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	"Critical Issues in Head and Neck Oncology", Springer Science and Business Media LLC, 2021 Yayın	<% 1