



**KANSER KÖK HÜCRE VARLIĞININ ORAL KANSER VE ORAL
DİSPLAZİDEKİ YERİ**

Özlem ÖZER YÜCEL

**DOKTORA TEZİ
ORAL PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2016

Dr.Özlem ÖZER YÜCEL tarafından hazırlanan “Kanser Kök Hücre Varlığının Oral Kanser ve Oral Displazideki Yeri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Oral Patoloji Anabilim dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN

Anabilim Dalı, Üniversite Adı: Oral Patoloji A.D, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum / ~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Ömer GÜNHAN

Anabilim Dalı, Üniversite Adı: Patoloji Anabilim Dalı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum / ~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Benay YILDIRIM

Anabilim Dalı, Üniversite Adı: Oral Patoloji A.D, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum / ~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç. Dr. Burcu SENGÜVEN

Anabilim Dalı, Üniversite Adı: Oral Patoloji A.D, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum / ~~onaylamıyorum~~



Üye: Doç.Dr. Armağan GÜNAL

Anabilim Dalı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Patoloji

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum / ~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma tarihi: 29.07.2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum

Prof. Dr. Mustafa ASLAN


Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.


Özlem Özer Yücel
29/07/2016

KANSER KÖK HÜCRE VARLIĞININ ORAL KANSER VE
ORAL DİSPLAZİDEKİ YERİ

(Doktora Tezi)

Özlem ÖZER YÜCEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2016

ÖZET

Oral kanser gelişiminde, kanser kök hücrelerinin varlığı kabul edilmekle birlikte; kanser kök hücrelerinin premalign lezyonlardaki varlığı ve displaziden kansere geçiş sürecindeki moleküler mekanizmalar açıklığa kavuşmamıştır. Özellikle oral displazi ve oral skuamöz hücreli kanserde (SHK) epiteliyal mezenkimal geçiş (EMT) ve kanser kök hücre ilişkisini inceleyen klinikopatolojik bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Retrospektif olarak planlanan çalışmamızın amacı oral displazi ve SHK’ de, EMT programını aktive eden Snail ve E-kadherin ekspresyonunu belirlemek ve kanser kök hücresi-EMT ilişkisini incelemektir. Çalışmamız, “Epitelyal Displazi” (n=23), “Skuamöz Hücreli Karsinom” (n= 16), ve “Epiteliyal Hiperplazi” (n=19) tanısı almış toplam 58 adet parafine gömülü doku örneği üzerinde yürütüldü. Parafine gömülü doku örneklerinden immünohistokimyasal boyama ve RNA izolasyonu için kesitler alındıktan sonra, kanser kök hücre belirteçleri CD133, CD44, ve E-kadherin immünohistokimyasal olarak; Snail ve CD133 ekspresyonu ise immünohistokimya ve RT-PCR ile analiz edildi. Elde edilen veriler, histopatolojik korelasyon kurularak, etkinliği değerlendirildi. Tüm parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması ve histopatolojik korelasyonu istatistiksel olarak değerlendirildi. SHK vakalarında, CD133 immünoekspresyonu ve inflamasyon skoru diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek; E-kadherin immünoekspresyonu ise istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0.05$). RT-PCR Snail mRNA ekspresyonu gösteren olgular içerisinde SHK grubunda olguların %100’ünde artış izlendi. Bu oran, displazi olgularında % 85 ve hiperplazi grubunda ise %82,5 olarak saptandı. Hiçbir grupta Snail ekspresyonu ile tümör diferansiyasyonu ya da displazilerdeki derecelendirme gibi histopatolojik parametreler arasında anlamlı bir korelasyon izlenmedi. Bu da Snail ekspresyonundaki artışın bağımsız bir parametre olarak değerlendirmesi gerektiğini düşündürmektedir. Çalışma bulgularımız, CD133 ve E-kadherin’in oral kanser progresyonunda potansiyel diagnostik belirteç olabileceğini desteklemektedir.

Bilim Kodu : 1069
Anahtar Kelimeler :Oral kanser, kanser kök hücresi, epiteliyal mezenkimal geçiş,
displazi
Sayfa Adedi : 88
Danışman : Prof. Dr. Sibel Elif Gültekin

THE ROLE OF CANCER STEM CELLS IN ORAL CANCER AND
ORAL DYSPLASIA

(Ph. D. Thesis)

Özlem ÖZER YÜCEL

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2016

ABSTRACT

The role of cancer stem cells in oral cancer is widely accepted, yet the existence of cancer stem cells in dysplastic tissue and the molecular pathways of progression from dysplasia to malignancy remains to be explored. There has not been any clinicopathological data available about the epithelial mesenchymal transition (EMT) – cancer stem cell (CSS) interaction in oral dysplasia and cancer yet. Therefore our retrospective study aimed to analyse the presence of CSS in oral epithelial dysplasia, and oral squamous cell carcinoma (SCC) in relation with two EMT markers: Snail and E-cadherin. The study was conducted on 58 formalin fixed, paraffin - embedded tissue samples diagnosed as “ epithelial dysplasia” (n=23), “squamous cell carcinoma” (n=16) and “epithelial hyperplasia” (n=19). The expression of Snail and CD133 was detected by both immunohistochemistry and quantitative RT-qPCR, whereas CD44 and E-cadherin was evaluated immunohistochemically. Oral SCC cases showed significantly higher CD133 immunoreactivity and inflammation scores and significantly decreased E-cadherin expression in comparison to dysplasia and hyperplasia groups. ($p < 0.05$). Snail mRNA up-regulation was seen in 100 % of the SCC cases followed by 85 % for dysplasias and 82,5 % hyperplasias among the cases which displayed positive mRNA expression by RT-qPCR. No statistically significant correlations were found between Snail expression and histopathological parameters like tumor differentiation and grading in dysplasias. This data shows that the increase in Snail expression might be an independent parameter. The results of our study provides an evidence that CD133 and E-cadherin may be potential diagnostic markers in oral cancer progression.

Science Code : 1069

Key Words :Oral cancer, cancer stem cell, epithelial mesenchymal transition, dysplasia

Page Number : 88

Advisor : Prof. Dr. S. Elif GÜLTEKİN

TEŞEKKÜR

Sadece tez çalışmamda değil, Oral Patoloji A.D'nde bulunduğum tüm süre boyunca samimi desteğini her an hissettiğim anabilim dalı başkanımız ve tez danışmanım Prof. Dr. S. Elif Gültekin'e,

Doktora sürem boyunca yardımlarını, bilgi, tecrübe ve sonsuz hoşgörüsünü bir an dahi esirgemeyen, fikirleriyle bana ışık tutan ve Oral Patoloji alanında yetişmemize olanak sağlayan GATA Patoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Ömer Günhan'a,

Tez çalışmamın moleküler aşamalarında bana yol gösteren GATA Patoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Bülent Kurt'a ve sevgi ve sabrını esirgemeyen G.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji öğretim üyesi, sevgili arkadaşım Doç. Dr. Burcu Sengüven'e,

Bilgi birikimleri ve güler yüzleri ile doktora çalışmama sonsuz katkıları olan G.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji öğretim üyeleri Doç. Dr. Benay Yıldırım ve sevgili arkadaşım Doç. Dr. Emre Barış'a,

Doktora çalışmamın laboratuvar aşamalarının gerçekleşmesinde gösterdikleri çaba ve özveriden dolayı Leyla Arslan, Büşra Özsoylar ve Emrah Özenç'e,

Huzurlu ve içten bir çalışma ortamı yaratan sevgili çalışma arkadaşlarıma, ana bilim dalı sekreterimiz Gülsen Yardımcı ve personelimiz Cemal Yeşiyurt'a,

Sonsuz sabırları, sevgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme ve sevgili eşime,

Varlıklarıyla bana güç ve ilham veren canım oğlum Demir Kağan'a ve canım kızım Nehir'e

Bu projeyi destekleyerek gerekli maddi olanakları sağlayan TÜBİTAK'a,

İçtenlikle teşekkür ederim.

Bu araştırma "3001 Başlangıç Ar-Ge" projesi olarak 114S891 proje numarası ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Oral Kanser	5
2.1.1. Epidemiyoloji	5
2.1.2. Etyoloji	6
2.1.3. Klinik özellikler	6
2.1.4. Tümör yayılımı ve evreleme.....	7
2.1.5. Histopatoloji	7
2.1.6. Tedavi ve prognoz	9
2.2. Epitelial Displazi	10
2.2.1. Klinik özellikler	10
2.2.2. Sınıflandırma	10
2.2.3. Tedavi ve prognoz	12
2.3. Kanser Kök Hücreleri.....	13
2.4. Oral Kanserde Kanser Kök Hücrelerin Aktivasyonu	13
2.4.1. Kanser kök hücre yüzey belirteçleri	15

Sayfa

2.5. Kanser Kök Hücresi-Prognoz.....	17
2.6. Epiteliyal Mezenkimal Geçiş	18
2.7. EMT ve Kanser	19
2.7.1. EMT- tümör progresyonu	19
2.8. EMT ve Kanser Kök Hücresi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışma Materyalinin Seçimi	23
3.2. Histolojik Ön Değerlendirme ve Derecelendirme.....	23
3.3. İmmünohistokimyasal Analiz	24
3.4. Moleküler Analiz.....	27
3.5. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	33
4.1. Hasta Demografik Bilgiler	33
4.2. Histopatolojik Bulgular	36
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	39
4.4. İmmünohistokimyasal Histopatolojik Korelasyon	46
4.5. RT-PCR Bulguları	47
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ	65
KAYNAKLAR	67
EKLER.....	77
Ek-1.Etik Kurul Raporu	78
ÖZGEÇMİŞ	81

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Oral kavite kanserlerinde TNM evrelemesi.....	8
Çizelge 2.2. Epiteliyal displazilerin sınıflandırılması.....	11
Çizelge 2.3. Displazi kriterleri	11
Çizelge 2.4. Kanser kök hücrelerini tanımlamada kullanılan yüzey belirteçleri	17
Çizelge 2.5. Embriyogenezde EMT süreci	18
Çizelge 3.1. Snail immünreaktivitesinin değerlendirilmesi.....	26
Çizelge 3.2. E-kadherin ve CD44 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi	27
Çizelge 3.3. CD133 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi.....	27
Çizelge 4.1. Klinik ve demografik veriler	33
Çizelge 4.2. Klinik ve demografik verilerin gruplara göre dağılımı.....	33
Çizelge 4.3. Tüm olgulara ait histolojik derecelendirme.....	37
Çizelge 4.4. Tüm olgularda Snail, E-kadherin, CD44 ve CD133 immünreaktivitesi.....	45
Çizelge 4.5. Snail, CD44, CD133, ve E-kadherin immünreaktiviteleri arasındaki korelasyonun İncelenmesi	47
Çizelge 4.6. Rölatif Snail mRNA ekspresyon düzeyleri.....	49
Çizelge 4.7. Tüm gruplarda Snail mRNA düzeyleri ve immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki.....	50
Çizelge 4.8. Displazi grubunda düşük/yüksek dereceli olgularda Snail mRNA düzeyleri	51
Çizelge 4.9. SHK grubunda diferansiyasyon derecesi ve Snail mRNA düzeyleri	51

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. Olgularda gruplara göre cinsiyet dağılımı	34
Şekil 4.2. Olgularda gruplara göre ortalama yaş değerleri	34
Şekil 4.3. Epitelial hiperplazi grubunda anatomik yerleşimlerin dağılımı	35
Şekil 4.4. Displazi grubunda anatomik yerleşimlerin dağılımı.....	35
Şekil 4.5. Skuamöz hücreli karsinom grubunda anatomik yerleşimlerin dağılımı	36
Şekil 4.6. Tüm gruplarda Snail/E-kadherin immünreaktivitesi ortalama değerleri	42
Şekil 4.7. Tüm gruplarda CD44 ve CD133 immünreaktivitesi ortalama skor değerleri.....	44
Şekil 4.8. İmmünohistokimyasal parametrelerin olgulara göre dağılımı.....	46
Şekil 4.9. SHK grubunda rölatif snail mRNA düzeyleri	48
Şekil 4.10. Displazi grubunda rölatif snail mRNA düzeyleri	48
Şekil 4.11. EH grubunda rölatif snail mRNA düzeyleri	49
Şekil 4.12. Snail mRNA düzeyleri ve immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin gruplara göre dağılımı	50

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Oral kanserde kanser kök hücre aktivasyonu mekanizmaları.....	15
Resim 2.2. EMT-kanser kök hücre etkileşimi	21
Resim 3.1. RT-PCR koşulları	30
Resim 3.2. Hedef gen (snail) ve referans gene (β aktin) ait amplifikasyon eğrileri	31
Resim 4.1. Displazi olgularında histopatolojik bulgular	37
Resim 4.2. SHK olgularında histopatolojik bulgular.....	38
Resim 4.3. Snail immünreaktivitesi	40
Resim 4.4. E-kadherin immünreaktivitesi	41
Resim 4.5. CD44 immünreaktivitesi	43
Resim 4.6. CD133 immünreaktivitesi.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
dk.	dakika
mm²	milimetrekare
μ	mikron
sn.	saniye
Kısaltmalar	Açıklamalar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AJCC	American Joint Committee on Cancer
CD	Cluster of differentiaiton
cDNA	Complementary deoksiribonükleik asit
CSS	Cancer Stem Cell
Cq	quantification PCR cycle
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EH	Epitelyal Hiperplazi
EMT	Epitelial Mezenkimal Geçiş
IL	İnterlökin
MMP	Matriks metalloproteinaz
NF-κβ	Nuclear factor kappa beta
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Real Time Polimeraz zincirleme reaksiyonu
SCC	Squamous cell carcinoma
SHK	Skvamöz Hücreli Karsinom
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TNF-α	Tumör nekrozis faktör-alfa

1. GİRİŞ

Oral kavitede ve orofarinkste görülen malign neoplaziler mukoza, tükrük bezi veya ağzın diğer yumuşak ve sert dokularında gelişen epiteliyal, mezenşimal ya da hematolenfoid türde kanserleri kapsamaktadır. Ancak bu kanserlerin % 90'ından fazlasını mukozanın yüzey epitelinden köken alan skuamöz hücreli karsinom (SHK) oluşturmaktadır. Bu nedenle "oral kanser" terimi, ağız boşluğunun yüzey epitelinin skuamöz hücreli karsinomunu ifade etmektedir ve bu çalışmada da bu terim kullanılmıştır (Slootweg ve Eveson, 2005).

Oral kanser, insanda 6. sıklıkta görülmekle birlikte; tüm malignansiler içinde ölüm oranı açısından 8. sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahip olan oral kanser, tüm dünyada her yıl yaklaşık 300 000 ölüme yol açmaktadır. 2012 GLOBOCAN verilerine göre dünya çapında 300.373 yeni oral kanser vakası bildirilmiştir (Farley, Soerjomataram, ve Ervik 2012, Chatuverdi ve diğerleri, 2013). Oral kanser vakalarının yaklaşık % 50'si tanı aldığı anda ileri evrededir (evre III, evre IV). (Slootweg ve Eveson, 2005). Klasik tedavi yöntemleri, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bütün bu tedavi seçenekleri yüksek morbidite oranına sahip olduğu gibi, tedavi etkinliği de yetersizdir. Oral kanserin erken tanısı, hastaların yaşam sürelerini artırmada önemli bir faktördür ancak daha önemlisi oral kanser gelişiminin önlenmesidir (Speight, 2007). Oral kanser, klinik ya da mikroskopik olarak öncü bir lezyon olmaksızın de novo gelişebileceği gibi; premalign faz sonrası da gelişebilmektedir (Grizzle Srivastava, ve Manne, 2010).

Displazi, DSÖ tarafından, oral kanserin prekürsör (öncü) lezyonu olarak tanımlanmaktadır ve invaziv kansere geçişi displastik değişikliklerin derecesi ile doğrudan ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Reibel, 2013). Ancak bu lezyonların tamamı malign transformasyon göstermemektedir. Malign transformasyon riski yüksek olan prekürsör lezyonların belirlenebilmesi, ve zamanında tanınarak tedavi edilmesi, oral kanser gelişiminin önlenmesi için kritik önem taşımaktadır. Bu amaçla son dönemde hız kazanan bilimsel çalışmalar, oral displazilerin tanımlanması, sınıflandırılması ve prognozlarının öngörülebilmesini sağlayacak objektif moleküler belirteçlerin tanımlanmasını hedeflemektedir (Koboyashi, ve diğerleri, 2012).

Moleküler belirteçlerin tanımlanabilmesi için ise genetik ve epigenetik pek çok olayın yer aldığı oral kanser patogenezinin tam manası ile anlaşılması gerekmektedir (Scully, 2014). Bu bağlamda, kök hücre biyolojisi alanında kaydedilen gelişmeler, oral kanser patogenezinde de yeni yaklaşımların ortaya çıkmasına yol açmıştır. “Kanser kök hücresi” hipotezi; tümörün, kendini yenileyebilen, kök hücre özellikleri taşıyan ve proliferen olan kanser hücrelerinin çok küçük bir fraksiyonunu oluşturan hücrelerden köken aldığı temeline dayanmaktadır (Reya, Morrison, Clarke, ve Weissman 2001; Richard ve Pillai, 2010; Zhang, Filho, ve Nor 2012). Normal kök hücreler ve kanser kök hücrelerinin kendini yenileyebilme (self-renewal) özelliklerini düzenleyen mekanizmaların benzer olması; tümör hücrelerinin normal kök hücrelerden köken alabileceği ya da tümörün oluşması ve gelişmesinden kanser kök hücrelerinin sorumlu olabileceğini düşündürmüştür. Kanserle ilişkili olduğu düşünülen birçok sinyal yolağı aynı zamanda normal kök hücre gelişimini de regüle etmektedir. Notch, Sonic Hedgehog, Wnt/ β -catenin, HMGA₂, Bcl-2 ve Bmi-1 gibi major kök hücre geni sinyalizasyon yolaklarının, kanser kök hücrelerinin regülasyonunda da (diferansiyasyon ve self-renewal) da rol oynadığı bilinmektedir (Taipale ve Beachy, 2001). Kanser kök hücreleri ilk olarak lösemide tanımlanmış; daha sonra oral kanser dahil olmak üzere meme, beyin, pankreas, kolon, baş – boyun, gibi birçok solid tümörde “kanser kök hücresi” varlığı tanımlanmıştır (Visvader ve Lindeman, 2008). Baş-boyun kanserlerinde her 1/2500 hücreden daha az kanser kök hücresi olduğu öne sürülmektedir (Ishizawa ve diğerleri, 2012). Oral kanserde en sık kullanılan kök hücre belirteçleri arasında beta-1 integrin, CD71, E-kadherin, Beta-katenin ve CD44 yer almaktadır (Gonzalez-Moles, Scully, Ruiz-Avila ve Plaza-Campillo 2013). Ancak, kanser kök hücreleri için güvenilir belirteçler tam olarak aydınlatılmamıştır.

Son bilimsel araştırmalar, diferansiye hücrelerin “epitelial – mezenşimal transdiferansiyasyon” (EMT: polarize epitel hücrelerinin spesifik çevresel faktörlerin etkisiyle invaziv mezenşimal fenotipe farklılaşması) süreci boyunca kanser kök hücre özelliklerini kazanabildiğini desteklemektedir (Polyak ve Weinberg, 2009). EMT programının aktivasyonu, hücrelerin kendini yenileyebilme (self-renewal) ve limitsiz diferansiyasyon yeteneği kazanmalarına yol açmaktadır. Baş-boyun kanserlerinde (skumöz hücreli karsinom), EMT aktivasyonunda önemli rol oynayan Snail ekspresyonunun moleküler prognostik bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Smith, Theodoros VE Quintin 2013). Artmış Snail ekspresyonunun, E-kadherin’i baskılayarak; EMT programını ve baş-boyun kanserlerinde agresif davranışı tetiklediği bildirilmiştir. (Mendelsohn ve diğerleri,

2012). Yapılan literatür incelemesinde, günümüze kadar oral displazi ve oral kanser patogenezinde başta Snail olmak üzere EMT faktörleri - kanser kök hücre ilişkisini inceleyen klinikopatolojik bir çalışmanın bulunmadığı görülmüştür.

Bu bilgilerin ışığı altında beş yıllık yaşam süresi diğer pek çok kanser türüne oranla daha düşük olan oral kanserde ve öncü lezyonlarında, patogenezi aydınlatmaya ve olası moleküler belirteç saptamaya yönelik çalışmaların değerli olabileceği düşüncesiyle, displaziden kanser invazyonu sürecinde EMT - kanser kök hücre etkileşimini incelemeyi hedefledik. Bu sebeple oral potansiyel malign lezyonlarda ve oral skuamöz hücreli kanserlerde;

1. EMT’de rol alan faktörlerin (Snail, E-kadherin) ekspresyonunu, ve kanser kök hücreleri ile ilişkilerini analiz etmek,
2. Displaziden kansere geçişte kanser kök hücre belirteçlerinin (CD44, CD133) prognostik öneme sahip olup olmadığını araştırmak,
3. Elde edilen verilerle, klinikopatolojik korelasyon kurarak, kök hücre (CD44, CD133) ve EMT’de yer alan faktörlerin (Snail ve E-kadherin) tanısal ve prognostik etkinliğini değerlendirmek çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Kanser

Oral kaviteyi döşeyen skuamöz epitelden köken alan malignansiler “oral kanser” olarak adlandırılmaktadır. Oral kavite kanserleri, larenks kanserinden sonra baş boyun bölgesinde en sık rastlanan kanserlerdir. Tüm malignitelerin yaklaşık %2-5’ini oluştururlar (Ferlay ve diğerleri, 2012).

2.1.1. Epidemiyoloji

Oral kanser, dünyada en sık görülen 6. neoplazidir. DSÖ verilerine göre mortalite oranı açısından tüm malignansiler içinde 8. sıradadır. Ülkemizde ise oral kanser insidansı %3 ve yeni vaka sayısı ise 30.000 civarındadır (Farley ve diğerleri, 2012; Chatuverdi ve diğerleri, 2013). GLOBOCAN-IARC 2012 verilerine göre ABD’de her yıl ortalama 45 000 yeni vaka, dünyada ise 650 000 vaka teşhis edilmektedir. Yıllık mortalite oranı ise tüm dünyada 100.000 de %2.6 olarak bildirilmiştir (Farley ve diğerleri, 2012). Amerikan Kanser Birliği (American Cancer Society) 2015 yılı için 45.780 yeni vaka teşhis edileceğini ve bunlardan 8650’sinin kaybedileceğini öngörmüştür (Siegel, Miller ve Jemal, 2015)

Oral kanser insidansı cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Oral kanser, erkeklerde kadınlara oranla 2,5 kat daha sıklıkla görülmektedir. Bu durum tütün ve alkol tüketiminin erkeklerde daha yüksek olmasıyla açıklanmaktadır. Erkeklerde, Fransa, İsviçre, kuzey İtalya ve özellikle Macaristan gibi batı Avrupa ülkelerinde oral kanser insidansı (ortalama 100.000’de %2.7) yüksektir. Güney Asya’da her iki cinste de artış izlenirken, özellikle Maldivler, Srilanka Pakistan da erkelerde 1. sırada görülen kanserdir (Farley ve diğerleri, 2013).

Oral kanserler sıklıkla 50 yaş üstünde görülmekle birlikte, son verilere göre orofaringeal ve oral kanser görülme yaşı ortalama 62,0 olarak bildirilmektedir. (Howlader ve diğerleri, 2014; Bethesda, 2015). Anatomik yerleşime göre değerlendirildiğinde, 2008’den 2012’ye kadar orofaringeal kanserlerin insidansında %3; dil kanserlerinde %2.1; ağız tabanı- dişeti ve oral kavitenin diğer bölgelerinde ise %23.6 oranında artış rapor edilmiştir (Howlader ve diğerleri, 2014; Bethesda, 2015).

Son yıllarda ABD ve kuzey avrupa ülkelerinde genç erkeklerde oral kanser insidansının son on yıl içerisinde arttığı bildirilmektedir (Siegel, Miller, ve Jemal, 2013).

2.1.2. Etyoloji

Birçok karsinogenetik ve genetik risk faktörleri oral kanserin gelişimi ve progresyonuna yol açar. Bunların içerisinde başta sigara ve alkol olmak üzere, demografik faktörler (yaş ve etnik köken), cinsiyet, yüksek riskli Human Papillomavirüs (HPV) tipleri (16 ve 18), kronik inflamasyon ve güneş ışını multifaktoriyel bir hastalık olan oral kanser gelişiminde risk faktörleri olarak rol oynamaktadır (Chen ve diğerleri, 2010).

Sigara ve alkol kullanımı dışında, özellikle Hindistan, Asya'nın güneydoğusu, Çin ve Tayvan'da aveca nut, betel nut gibi ürünlerin kullanımı, oral ve orofaringeal kanserlerin etyolojisinde etkilidir (Weitkunat, Sanders ve Lee, 2007).

HPV 16 ve 18 in özellikle tonsiller ve orofaringeal kanserlerin yaklaşık %40'ında etkili olduğu bilinmekte birlikte, oral kanserlerin küçük bir bölümünde etyolojik rolü olduğu bildirilmiştir (Mirghani, Amen, Moreau, Lacau ve Guily, 2015). Dudak kanseri insidansı güneş ışınlarından kaynaklanan ultraviole dalgalarının eğiminin dik gelmesi nedeniyle Avustralya ve ABD'nin ekvatora yakın bölgelerinde yüksek seyretmektedir (Chaturvedi, Anderson ve LortetTieulent, 2013).

2.1.3. Klinik özellikler

Oral kanser, klinik ya da mikroskopik olarak öncü bir lezyon olmaksızın de novo gelişebileceği gibi; premalign faz sonrası da gelişebilmektedir. Klinik olarak normal görünümdeki oral mukoza, papiller hiperplazi ya da değişen derecelerde displastik özellikler gösteren lezyonlarda oluşan genetik ve epigenetik alterasyonların birikimi sonucunda ortaya çıkar (Grizzle ve diğerleri, 2010).

Oral kavitede sıklıkla bukkal mukoza, dişeti, sert damak, dilin 2/3 anterioru, dorsal lateral ve ventral yüzeyleri ve ağız tabanında ortaya çıkabilir. Küçük asemptomatik tümörler genellikle ağız tabanı, dilin ventrolateral bölgeleri ve yumuşak damakta klinik olarak kırmızı, kırmızı-beyaz lezyonlar ya da beyaz plaklar şeklinde görülebilir. Ancak birçok hastada mukozal büyüme ülserasyon, ağrı, ağız kokusu, konuşma ağız açma ve yutkunmada

güçlük, kanama ve kilo kaybı gibi belirtiler gözlenir. İlerlemiş kanserlerde nekroz alanları içeren ülseroproliferatif büyümeler izlenebilir. Terminal dönemde ise orokütanöz fistüller, şiddetli anemi ve kaşeksi klinik tabloya eşlik edebilir (Johnson ve diğerleri, 2005)

Bukkal mukozada genellikle kenarları kalkık ülserler; dilde ülser, kırmızı alanlar ya da nodüller; ağız tabanında küçük kırmızı lezyonlar, ülserler ya da papiller lezyonlar şeklinde izlenebilir (Johnson ve diğerleri, 2005).

Dişetinde daha çok ülseroproliferatif büyümeler; sert damakta ülserden çok papiller ve ekzofitik büyümeler şeklinde görülür. Yumuşak damak ve uvulada ise sıklıkla ülseratif lezyonlar halinde izlenir. Güney Asya'da dişeti ve bukkal mukozada görülen SHK'lerin 2/3'ünde sub-mandibuler lenf nodları pozitif olarak bildirilmiştir (Su ve Ho, 2007).

2.1.4. Tümör yayılımı ve evreleme

Ağız tabanı ve dilin lateral kenarlarındaki SHK'lar sub-mukozaya doğru derin invazyon gösterirken, sert damakta genellikle süperfisiyal gelişim izlenir. SHKların çene kemiklerine invazyonu sıkça izlenen bir sorundur. Mandibula maksillaya göre daha çok tutulmaktadır. Dişli çenelerde mandibulaya yayılım periodontal ligament yoluyla gerçekleşir. Dişsiz bölgelerde ise alveol kretten direkt olarak kemik trabekülleri arasından kemik iliğine ilerleyebilir (Chi, Day ve Neville, 2015).

Oral kanserlerin prognoz tayini ve tedavide Amerikan Kanser Komitesi'nin (American Joint Committee on Cancer staging) 2002'de güncellediği TNM evreleme sistemi kullanılmaktadır. Bu sistem temel olarak tümörün boyutu ve lokal yayılımı (T), boyundaki lenf nodlarının boyutu ve sayısı (N), ve uzak metastaz olup olmadığı (M) üzerine kurulmuştur (Çizelge 2.1) (Greene ve diğerleri, 2002).

2.1.5. Histopatoloji

Oral kanser, mukozanın yüzey epitelinden gelişen skuamöz hücreli karsinomdur. Skuamöz diferansiyasyon, "inci" formunda görülen keratinizasyon (keratin incisi), ve invaziv büyüme paterni SHK'in histolojik özellikleridir. Histolojisinde, bazal membran bütünlüğünün bozulması, epitelin bazal tabakalarında yapısal düzensizlikler ve irregüler sitoplazmik

çıkıntıları lamina propriyaya doğru uzanan bazal keratinositler izlenir. Bazı vakalarda sitolojik atipi ve mitoz belirgin olabilir.

Çizelge 2.1. Oral kavite kanserlerinde TNM evrelemesi

Primer Tümör (T)	
To	Primer tümör yok
T _{is}	in situ karsinom
T1	Tümör 2 cm yada daha küçük
T2	Tümör 2 cm'den büyük fakat 4 cm'den küçük
T3	Tümör 4 cm'den büyük
T4a	Tümör çevre dokuları invaze etmiş. (ör., kortikal kemik, derin dil adeleleri [genioglossus, hiyoglossus, palatoglossus ve stiloglossus], maksiler sinüs , yüz derisi)
T4b	Tümör mastikatör boşluğu, pterigoid kemiği, veya kafa tabanını invaze etmiş ve/veya internal karotid arter tutulumu var.

Not: Gingiva primerinin oluşturduğu tek başına yüzeysel kemik/diş soketi erozyonu tümörü T4 olarak sınıflamak için yeterli değildir.

Bölgesel Lenf Nodları (N)	
N _x	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
No	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek, ipsilateral, 3 cm ya da küçük lenf nodu metastazı
N2a	Tek, ipsilateral, 3 cm 'den büyük 6 cm'den küçük lenf nodu metastazı
N2b	Birden çok, ipsilaterallenf nodu metastazı, hiçbiri 6 cm 'den büyük değil
N2c	İki taraflı veya kontralaterallenf nodu metastazı, hiçbiri 6 cm 'den büyük değil
N3	Çapı 6 cm'den büyük lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)	
Mx	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Evreleme Grupları			
Evre 0	T _{is}	N0	M0
Evre I	T1	N0	M0
Evre II	T2	N0	M0
Evre III	T3	N0	M0
Evre IVA	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
Evre IVB	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
	Her T	N3	M0
	T4b	Her N	M0
Evre IVC	Her T	Her N	M1

Geleneksel olarak, “iyi” “orta” ve “az” diferansiye olarak derecelendirilirler. İyi diferansiye SHK’ler, normal skuamöz epitele benzerlik gösterir. Orta derecede diferansiye SHK’lerde belirgin nükleer pleomorfizm ve mitotik aktivite ve daha az keratinizasyon görülür. Az

diferansiye tümörlerde immatür hücreler baskındır. Çok sayıda tipik ve atipik mitoz ve minimal keratinizasyon izlenir. SHK'lerin büyük bir kısmı orta-dereceli diferansiye tümörlerdir. Diferansiyasyonun prognostik değeri, invazyon paternine oranla çok daha azdır (Johnson ve diğerleri, 2005).

Tümörün invaziv yüzünde ekspansil patern, infiltratif patern ya da her ikisi birarada izlenebilir. SHKlara genellikle stromal reaksiyon eşlik eder. Tümör stromasında genellikle ekstraselüler matriks birikimi ve myofibroblast proliferasyonu ile karakterli dezmozoplazi ve neovaskularizasyon görülür. Tümör adalarının etrafında sıklıkla plazma hücreleri, lenfosit ve makrofajların oluşturduğu mononükleer iltihabi hücre infiltrasyonu gözlenir (Johnson ve diğerleri, 2005).

SHK'un histopatolojik olarak farklı özellikler taşıyan alt tipleri bulunmaktadır. Bunlar verrüköz, içsi hücreli (sarkomatoid), bazoskuamöz, papiller, akantolitik ve adenoskuamöz karsinomdur. Bunlar içerisinde verrüköz karsinom en iyi prognoza sahipken, bazoloid ve sarkomatoid alt tipler klasik SHK'ya oranla daha agresif bir seyir takip eder. (Cardesa ve diğerleri, 2005).

2.1.6. Tedavi ve prognoz

Tedavide erken evrelerde cerrahi, ve radyoterapinin eşit başarı sağladığı bildirilmektedir. İleri evre tümörlerde ise cerrahi ve postoperatif radyoterapi tedavi seçeneğidir. Kemoterapi nadiren uygulanır. Bütün bu tedavi seçenekleri yüksek morbidite oranına sahip olduğu gibi, tedavi etkinliği de yetersizdir (Cooper ve diğerleri, 2004).

Tümör büyüklüğü ve lenf nodu metastazı en belirleyici prognostik faktörlerdir. Tümörün 5mm ya da daha büyük olması, servikal lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur. Tümör kalınlığı 5 mm'den az ise lenf nodu tutulumu %13, 10 mm den fazla ise % 48 olarak bildirilmiştir (Toporcov ve diğerleri, 2015).

Tümörün invaziv marjinlerinde kordlar ve küçük hücre grupları şeklinde infiltrasyonların olması daha agresif davranışı düşündürmektedir. Ancak histolojik evreleme prognozla daha zayıf korelasyon göstermektedir (Toporcov ve diğerleri, 2015). Diğer prognostik faktörler, iki ya da daha fazla sayıda pozitif lenf nodu, ekstrakapsüller yayılım, ve rezeksiyon

materyalinde pozitif marjinler olarak sıralanabilir. Tümör kalınlığı ve vasküler invazyon gibi histolojik özellikler de zayıf prognozla ilişkilidir. Moleküler prognostik belirteçler henüz araştırma düzeyinde olup, rutin uygulamada tanımlanmış güvenilir bir belirteç bulunmamaktadır. (Chi ve diğerleri, 2015).

2.2. Epiteliyal Displazi

“Displazi” epitel doku için kullanılan ve hücrelerde uniforme ve oryantasyon kaybını ifade eden bir terimdir (Amagasa, 2011). “Epiteliyal displazi” Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından, oral kanserin prekürsör lezyonu olarak tanımlanmaktadır. Şiddeti arttıkça invaziv karsinoma dönüşme potansiyeli artmaktadır. Displastik lezyonların, klinik ve histopatolojik özelliklerinin tanımlanması, doğru teşhisi ve zamanında tedavisi malign transformasyonun önlenmesi açısından önem taşımaktadır.

2.2.1. Klinik özellikler

Klinik olarak oral epiteliyal displazi, beyaz (lökoplaki); kırmızı mukozal lezyon (eritroplaki); ya da her ikisinin karışımı olan “eritrolökoplaki” şeklinde görülebilir. Ancak klinik olarak normal görünen mukoza da displastik özellikler taşıyabilir (Speight, 2007).

Lökoplaki ve eritroplaki klinik olarak “pre-malign” lezyonlar olarak değerlendirilmektedir. Bu lezyonlar histolojik olarak atrofik ya da hiperlazik olabildiği gibi; displastik özellikler içerebilir ya da içermeyebilir. Lökoplaki prevalansı %1,49 - %4,27 arasında; displastik özellikler taşıyan lökoplakilerin malign transformasyon riski ise %10 olarak bildirilmektedir (Grizzle ve diğerleri, 2010). Klinik olarak homojen görünümde olmayan lökoplakilerde malign transformasyon riski daha yüksektir (Scully, 2014).

2.2.2. Sınıflandırma

DSÖ tarafından 1997 yılında yayınlanan “*Oral mukozada kanser ve prekanserin histopatolojik sınıflandırması*” bütün dünyada altın standart olarak kullanılmaktadır (Pindborg, 1997). Epiteliyal displazi geleneksel olarak “hafif”, “orta”, “ağır”, ve karsinoma in situ olarak 4 kategoriye ayrılmıştır. İn situ karsinom epiteliyal displazinin en üst basamağını temsil eden pre-invaziv malignansi olarak değerlendirilmektedir. Bu sınıflandırma basit görünmesine karşın, epiteliyal displazinin derecelendirilmesi, objektif

kriterlerin yokluğu nedeniyle zordur. Birçok çalışmada derecelendirmenin yanısıra, displazinin varlığı/yokluğu ile ilgili araştırmacılar arasında bireysel varyasyonlar olduğu belirtilmiştir (Warnakulasuriya, 2008). Oral epiteliyal displazinin sınıflandırılması için kullanılan çeşitli sistemler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Epiteliyal displazilerin sınıflandırılması

WHO 2005	Oral Intraepiteliyal Neoplazi (OIN)	Ljubljana (Laringeal keratoz)	Binary sistem (Kujan, 2006)
Displazi yok	n/a	Basit hiperplazi	
Hafif	OIN 1	Bazal/parabazal hiperplazi	Düşük risk
Orta	OIN 2	Atipik hiperplazi	Yüksek risk
Ağır	OIN 3	İn situ karsinom	Yüksek risk
In situ karsinom	OIN 3		Yüksek risk

Warnakulasuriya, 2008

DSÖ tarafından 2005 yılında düzenlenen *Oral Kanser ve Prekanser Çalıştay*ında displazinin derecelendirilmesinde kullanılan kriterler yapısal ve sitolojik olarak iki grupta toplanmıştır (WHO, 2005) (Çizelge 2.3). Displazi şiddeti doğrudan belirlenen kriterlerin sayısı ile ilişkilidir. Bu kriterlerin sayıca fazla olması displazi şiddetini artırır. Bu değişiklikler epitelin 1/3 alt kısmında bulunuyorsa “hafif”, 2/3 orta kısmında bulunuyorsa “orta”, 2/3’lük kısmını geçerse “ağır” displazi, tüm katmanlarda görülürse “in situ karsinom” olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 2.3. Displazi kriterleri

Yapısal kriterler	Sitolojik kriterler
1. Epitel tabakalanmasında oryantasyon kaybı	Asinonükleosiz (nükleer büyüklükte anormal varyasyon)
2. Baza lhücrelerde polarite kaybı	Nükleer pleomorfizm
3. Damla şekilli rete-uçları	Anisositoz (hücre boyutunda anormal varyasyon)
4. Mitotik figürlerin sayısında artış	Hücresel pleomorfizm
5. Yükselmiş mitoz	Artmış nükleus/sitoplazma oranı
6. Diskeratoz	Nükleus boyutunda artış
7. Retelerde keratin incileri	Atipik mitotik figürler
	Belirgin nükleoller ve nükleol sayısında artış
	Hiperkromazi

WHO, 2005

2007’de Kujan ve diğerleri (2007), DSÖ’nün 2005’te yayınladığı morfolojik kriterleri kullanarak, seçenekleri daha aza indirgeyen iki kademeli sınıflandırmayı [İkili sistem, “düşük risk” (hafif); “yüksek risk” (orta-ağır)] önermişlerdir. Klinik tablo ve histolojik derecelendirme arasındaki ilişki incelenerek “yüksek risk” lezyonlar için uç değeri en az 4 yapısal kriter ve 5 sitolojik kriterin birarada olması şeklinde; “düşük risk” lezyonlar için ise uç değeri 4 yapısal kriterden ve/veya 5 sitolojik kriterden (Çizelge 2.3) daha az olarak

belirlenmiştir. Kujan ve diğerleri (2007), bu iki aşamalı kantitatif sistemin prognostik değerini incelemiş, malign transformasyonun öngörülmesinde bu sistemin %85 sensitivite ve % 80 spesifiteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak DSÖ kriterleri kullanılarak geliştirilen bu iki aşamalı sistem özellikle “orta dereceli” displazilerde klinisyenleri kritik karar verme doğrultusunda yönlendirebilmektedir. Ayrıca bu derecelendirme prognostik etkinlik açısından geleneksel DSÖ sınıflamasına göre daha üstün olduğu ileri sürülmüştür (Kujan ve diğerleri, 2007).

2.2.3. Tedavi ve prognoz

Oral displastik lezyonların cerrahi olmayan tedavisi, takip; sigara ve alkol gibi risk faktörlerinin azaltılması; retinoid ve antimikotiklerin kullanılması gibi yöntemleri içermektedir. Cerrahi tedavi için ise lazer, kriyocerrahi ve geniş eksizyon protokolleri uygulanmaktadır. Hafif displazi ya da düşük riskli lezyonlarda tedavi tipinin belirlenmesinde lezyonun anatomik yerleşimi ve kliniği yönlendirici olmaktadır. Örneğin sigara içmeyen hastalarda görülen lökoplakiler ya da homojen olmayan lökoplakilerde, dilde ve ağız tabanı yerleşimi olanlarda, uzun süreli lokalizasyon, kadın hasta ve öyküsü uzun süreli olanlar, 200 mm²'den büyük lezyonlarda displazi derecesi hafif olarak belirlense bile, takipten çok cerrahi tedavi tercih edilmelidir. Karsinoma in situ ve mikro invazyonda geniş eksizyon yapılmalıdır. Orta ve ağır dereceli displazilerde, ve yüksek riskli bölgelerde ortaya çıkan hafif displastik lezyonlardaki tedavi seçenekleri farklılık gösterebilmektedir. Bu konuda henüz belli bir konsensusa ulaşılmamıştır (Amagasa, 2008).

Genel olarak displazi ağırlaştıkça, malign transformasyon riskinin arttığı kabul edilmektedir. Diğer yandan, displastik olmayan lezyonlar malign transformasyon gösterebilirken, şiddetli displazilerin de gerileyebileceği öne sürülmüştür. Örneğin, displastik lökoplakilerin kısmen ya da tamamen ortadan kalktığı bildirilmiştir (Beenken, 1999). Benzer şekilde serviksteki lezyonların 10 yıl boyunca tedavi edilmemelerine rağmen yaklaşık %25-35'nin gerilediği bildirilmiştir. Displazilerden malign progresyon gösteren lezyonların oranı %6-%36 arasında değişmektedir (Thomson ve diğerleri, 2008). Ancak günümüzde bir hastada “malign transformasyonun” öngörülebilmesi için tanımlanmış klinikopatolojik faktörler ya da belirteçler bulunmamaktadır.

2.3. Kanser Kök Hücreleri

İnsan vücudundaki bütün özelleşmiş hücreler, kendini yenileyebilme ve farklı matür hücrelere diferansiye olabilme kapasitesine sahip doku-spesifik “kök hücreler”den farklıdır (Reya, Morrison, Clarke ve Weissman, 2001).

Klasik ya da stokastik tümörögenез modeline göre, normal kök hücrelerdeki mutasyonel değişiklikler sonucu selektif büyüme potansiyeli kazanan bu hücreler neoplastik hücrelere dönüşür. Bu hücre klonu ek mutasyonlar kazanarak tümörü oluşturur. Bu hipotezde tümörü oluşturan bütün hücrelerin benzer tümörojenik kapasiteye sahip olduğu; diğer bir deyişle tamamının tümör oluşturabileceği düşünülmektedir (Reya, 2001). Ancak son bilimsel araştırmalar tümörü oluşturan hücrelerin küçük bir fraksiyonunun (tüm tümör hücre popülasyonunun %1’den azı) tümörojenik kapasiteye sahip olduğuna işaret etmektedir (Richard ve Pillai, 2010; Zhang, Filho ve Nor, 2012).

“Kanser kök hücresi” hipotezi tümör oluşumu ve progresyonunu yönlendiren bir grup tümör hücresinin varlığına dayanmaktadır. Kanser kök hücrelerden köken alabileceği teorisi ilk olarak 20. yüzyıl başlarında Julius Cohnheim tarafından ortaya atılmıştır (Cohnheim, 1875). Cohnheim (1875), tümörlerin embriyonik hücre artıklarından gelişebileceğini belirtmiştir. Daha sonra Beard, yetişkin dokulardaki germinal hücrelerin aktive olarak tümör oluşturabileceğini öne sürmüştür (Beard, 1902). Kanser kök hücreleri ilk kez akut myeloid lösemide Bonnet ve Dijk (1997) tarafından izole edilmiş; 2003’te ise Al Haji (2003), solid tümörlerdeki kanser kök hücrelerini tanımlamıştır. “Kanser kök hücresi” terimi “Amerikan Kanser Araştırma Birliği Kanser Kök Hücre Çalıştay Grubu tarafından kendini yenileyebilme (self renewal) ve heterojen tümör hücrelerini oluşturabilme yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanmıştır (Clarke ve diğerleri. 2006).

2.4. Oral Kanserde Kanser Kök Hücrelerin Aktivasyonu

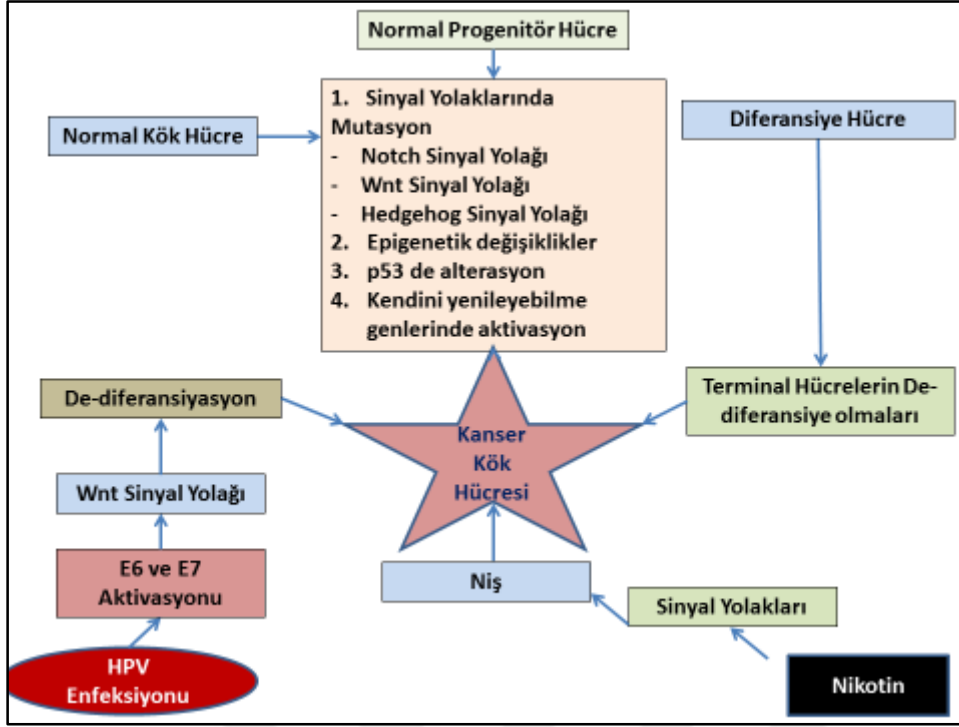
Karsinogenesis, çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu oluşan çok basamaklı bir olaydır. Bu gelişim sürecinde başta TP53 ve Rb gibi tümör baskılayıcı genlerin önemli rol oynadığı bilinmektedir (Knudson ve diğerleri, 1973). Birçok farklı dokuda kanser kök hücresi aktivasyonunun tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar sonucu aktive olduğu düşünülmektedir. Kök hücrelerin uzun süre varolabilme özellikleri çok sayıda genetik ve

epigenetik değişiklikleri biriktirmelerine ve kanser kök hücrelerine dönüşmelerine yol açabilir. Her kök hücre bölündüğünde biri özelleşmiş bir hücre diğeri ise “yenilenme kapasitesi olan hücre” olacak şekilde asimetric olarak çoğalır. Tümörögenez sürecinde ise kök hücreler iki “yenilenme kapasitesi olan hücre” oluşturacak şekilde simetric olarak çoğalır. Simetric bölünmenin defalarca tekrarlanması klonal ekspansiyona yol açar (Kazi, Sayed ve Dwivedi, 2010). Her iki bölünme de Wnt, Hedghog, Notch ve Oct-4 gibi sinyal yolakları tarafından tetiklenir (Benson ve diğerleri, 2004).

Kanser kök hücreleri kök hücrelerden köken alabileceği gibi kendini yenileyebilme özelliği kazanan diferansiye hücrelerden de gelişebilir. Normal kök hücrelerden kanser kök hücre transformasyonu birtakım mekanizmalar yoluyla olabilir:

- Dokularda bulunan normal kök hücrelerin transformasyonu
- Erken dönem progenitor hücrelerdeki mutasyonel değişiklikler sonucu bu hücrelerin kendini yenileyebilme özelliği kazanması
- Terminal diferansiye hücrelerin ya da geç dönemdeki progenitor hücrelerin de-diferansiye olması

Bu mekanizmalarda onkogenlerin aktivasyonu, ya da tümör süpresör genlerin inaktivasyonu rol oynar (Lotem ve Sachs, 2006). Ek olarak tümör mikroçevresi, kanser kök hücre nişleri, ve sitokin yolakları kanser kök hücrelerinin devamlılığı ve tümör progresyonunda etkili olabilir. Kanser kök hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi heterojen bir grup hücrenin ve hücrelerarası matriksin oluşturduğu “nişler” içinde bulunurlar. Bu nişlerin Wnt, Hedghog, Notch ve Oct-4 sinyal yolaklarını tetikleyerek, kanser kök hücrelerinin ekspansiyonunda önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (Resim 2.1).



Resim 2.1. Oral kanserde kanser kök hücre aktivasyonu mekanizmaları

Kanser kök hücreleri normal kök hücreler gibi kendilerini ölümsüz kılan özelliklere sahiptirler (Lotem ve Sachs 2006) Bunlar sırasıyla:

- Kendini yenileyebilme
- Matür hücrelere farklılaşabilme
- Kendini yenileyebilme özelliklerinin düzenlenmesinde Wnt, Hedghog, Notch ve Oct-4 gibi ortak sinyal yolaklarının kullanılması
- Pluripotentiği ve hücresele ölümsüzlüğü başlatan faktörlerin ekspresyonu
- Aktif telomerez aktivasyonu
- Aktif membran transport aktivitesi
- Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanması
- Anjiyogenezi stimüle eden anjiyopoetik faktörlerin salgılanması

2.4.1. Kanser kök hücre yüzey belirteçleri

Kanser kök hücreleri, spesifik yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile de gösterilebilir. İlk çalışmalar “cluster of differentiation” (CD) olarak ta bilinen yüzey moleküllerini kullanarak lösemik kök hücrelerini belirlemeye yönelik yapılmıştır. Akut myeloblastik lösemi (AML) hastalarından izole edilen CD34⁺/CD38⁻ kök hücreler total AML hücrelerinin yaklaşık %

0.2'lik bir fraksiyonunu oluşturmasına rağmen, immünsüpresif farelere transfer edildiğinde diğer AML hücrelerinden farklı olarak farelerde AML oluşturabilen tek hücre grubu olmuştur (Bonnet ve Dick, 1997).

CD44, CD133, CD24 gibi yüzey belirteçlerini eksprese eden hücreler flow sitometri yöntemiyle izole edilerek immünsüpresif farelere transplante edildiğinde, diğer hücelere oranla yüksek tümörojenik kapasiteye sahip oldukları gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2010; Chen ve diğerleri, 2013).

Hematopoetik kanserlerde izolasyonu takiben, beyin, meme, akciğer, prostat, over, kolorektal, oral kanser dahil olmak üzere solid tümörlerde kanser kök hücreleri tanımlanmıştır (Visvader ve Lindeman, 2008). Al-Haji ve diğerleri (2003) insan meme kanseri hücrelerinden izole ettikleri kanser kök hücrelerinin çok az sayıda bile (200 kadar hücre) farelerde tümör oluşturabildiğini göstermiştir. Bu hücrelerin immünfenotipi CD44+/CD24- olarak tanımlanmıştır. Yine meme kanserinde tanımlanan CD44+ hücrelerin, yüksek düzeyde Bmi-1 eksprese ettiği, self-renewal ve farklılaşma kapasitelerine sahip oldukları rapor edilmiştir (Prince ve diğerleri, 2008).

Kök hücreler tarafından eksprese edilen spesifik yüzey moleküllerinin (CD133, CD44, CD34, CXCR4, CD38.vb) tanımlanması, tümör dokusu içinde az miktarda bulunan kanser kök hücrelerinin diğer tümör hücrelerinden ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu yüzey belirteçleri doku spesifik olabilir. Farklı kanserlerdeki kanser kök hücre yüzey belirteçleri Çizelge 2.4 de belirtilmiştir. Epitelial tümörlerde CD44 ve CD133 sıklıkla öne çıkan kanser kök hücre yüzey belirteçleridir (Al-Haji ve diğerleri, 2003; Dalerba ve diğerleri, 2007; Clay ve diğerleri, 2010).

Lim ve diğerleri (2016) primer oral SHKlerden kanser kök hücreleri izole ederek, bu hücrelerin kök hücre özelliklerini değerlendirmişlerdir. Primer tümörden “florasan activated cell sorting” (FACS) yöntemiyle izole ettikleri bu hücrelerin kanser kök hücrelerinde bulunması gereken pek çok özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir.

Çizelge 2.4. Kanser kök hücrelerini tanımlamada kullanılan yüzey belirteçleri

Meme adenokarsinom	CD44+ ALDH+ CD24-	Al-Hajj ve ark. 2003
AML	CD34+ CD38- CD90- CD96+	Hosen ve ark. 2007
Kolorektal	CD133+ CD44+	Dalerba ve ark. 2007
Prostat adenokarsinom	CD133+ CD44+	Collins ve ark. 2005
Pankreatik adenokarsinom	CD133+ CD44+	Li ve ark. 2007
Hepatoselüler	CD133+ EpCAM CD90+	Suetsugu ve ark. 2006
Kolon	CD133+	Ricci-Vitiani ve ark. 2007, Çiçek 2010
Akciğer	CD34+ CD45- CD31-	Kim ve ark. 2005
Oral kanser	CD133+ CD44+/- ALDH+	Chen 2013, Zhang 2010, Clay 2010

Baş-boyun kanserlerinde kanser kök hücre izolasyonu yapan çalışmalarda genellikle kanser kök hücre belirteçleri (CD44, CD133) ya da aldehit dehidrogenaz enzim aktivitesi varlığı gösterilmiştir (Ishizawa ve diğerleri, 2012). Önceleri hematopoetik kök hücre belirteci olarak kullanılan CD133'ün, oral kanserde tümörü oluşturan hücrelerin yaklaşık %1-3 tarafından eksprese edildiği ve bu hücrelerin kemoterapiye direnç gösterdiği belirtilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2010).

Baş-boyun kanserlerinde izole edilen CD44+ tümör hücrelerinin yüksek tümörojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Bu hücre popülasyonu tümör hücrelerinin %10'dan azını oluşturmakla birlikte, immünsüpresif farelerde tümör oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Joshua ve diğerleri, 2012).

CD44'ün oral skuamöz kanserdeki prognostik değeri henüz açıklığa kavuşmamıştır. Bazı çalışmalarda CD44 ekspresyonu ve tümörün agresif davranışı arasında pozitif korelasyon bildirilirken (Chen ve diğerleri, 2013; Joshua ve diğerleri, 2012); diğerleri azalmış CD44 ekspresyonu ve kötü prognoz arasında korelasyon olduğunu öne sürmüşlerdir (Carinci ve diğerleri, 2002; Kosunen ve diğerleri, 2007; Clay ve diğerleri, 2010).

2.5. Kanser Kök Hücresi-Prognoz

Pek çok farklı malignitede kanser kök hücrelerinin kötü prognozla ilişkili olduğu desteklenmektedir. (Chen 2003, Clay 2010). Meme kanserinde hastalarında, dolaşımdaki CD44+, ALDH1 +) kanser kök hücrelerinin kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kapucuoğlu ve diğerleri, 2015). Diğer bir çalışmada ise akut myeloid lösemide, lösemik kök hücre fenotipi gösteren hücrelerin klinik tablo ve nüks ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gerber ve diğerleri, 2012). Diğer yandan kanser kök hücrelerinin “sessiz doğası”, hipoksik

nişlerde bulunmaları, DNA hasarında up-regülasyona ve ilaçların hücre dışına atılmasına yol açmaları gibi özellikleri nedeniyle kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç geliştirebilecekleri düşünülmektedir:

Ayrıca *in vivo* over kanser modelinde bazı hücrelerin kemoterapodiklere karşı direnç gösterdiği ve proliferatif kapasitelerinin yeniden aktive olduğu gösterilmiştir (Kusumbe, Mali ve Bapat, 2009).

2.6. Epiteliyal Mezenkimal Geçiş

EMT, epitel hücrelerinin karakteristiği olan inter-selüler bağlantıları düzenleyen genlerin ekspresyonunda azalmaya neden olarak; epitel hücrelerinin, mezenşimal özellikler (örn. migrasyon yeteneği) kazanmasını sağlayan bir hücresel farklılaşma sürecidir. EMT programı; Snail, Twist 1, ve Zeb-1 gibi, epiteliyal hücre polaritesi, hücre-hücre kontağı, sitoskeleton ve extraselüler matriks degradasyonunu düzenleyen çok sayıda proteinin ekspresyonunu yönlendiren bir dizi transkripsiyon faktörü tarafından aktive edilmektedir. Embriyonik gelişim boyunca epitel hücrelerinin mezenşimal fenotip kazanması gerekli bir süreçtir. Bu süreç boyunca hücreler hücre-hücre kontağı ve hücre polaritesi kaybının yanısıra migratuar ve invaziv özellikler kazanırlar.

Embriyogenez boyunca birçok doku ve organ; bir seri EMT ve mezenkimal epiteliyal transisyon (MET) süreçleri sonunda oluşur. Organların oluşması ve spesifik hücelere farklılaşma süreci birbirini takip eden farklı EMTlerle gerçekleşir. Bunlar primer, sekonder ve tersiyer EMT süreçleri olarak adlandırılır (Thiery, 2003) (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Embriyogenezde EMT süreci

Primer EMT	Sekonder EMT	Tersiyer EMT
Parietal endoderm	Anjiyoblastlar (kan damarları)	Endokard
Mezoderm formasyonu	Endokardiyal progenitörler	Kardiak kapakların oluşması
Nöral krest formasyonu	Hepatoblast migrasyonu	
	Pankreatik tomurcuk formasyonu	

EMT, morfogenezin yanısıra doku tamiri, doku homeostazı gibi fizyolojik olaylar ve organ fibrozisi ve tümör progresyonu gibi patolojik olaylarda da aktive olmaktadır. EMT ‘ye benzer süreçler zedelenmeye karşı oluşan fizyolojik cevapta da yer alır. Epiteliyal yara iyileşmesi boyunca yara kenarındaki keratinositler hücre-hücre kontaklarını gevşeterek

“intermediate mezenşimal fenotip” olarak adlandırılan özellik kazanırlar. Bu süreçte keratinositler Snail 2 ekspresyonu tarafından yönlendirilmektedirler (Arnoux, Nassour, L'Helgoualc'h, Hipskind ve Savagner, 2008). Benzer şekilde her menstrual siklusta over yüzey epiteli de EMT sürecine girer (Matsuzaki ve Darcha, 2012).

Fibrotik dokularda myofibroblastlar tarafından üretilen fazla miktarda kollajen, organ fonksiyonunda kayıba neden olmaktadır. Fibrozisin, interstisyel fibroblastların patolojik aktivasyonu sonucu gerçekleştiği düşünülse de; hücre çalışmaları fibrozise yol açan myofibroblastların önemli bir kısmının epitel hücrelerinden EMT yoluyla farklılaştığını desteklemektedir. Renal tübül ve kanal hücreleri, lens epiteli, endotel, hepatositler ve kardiyomyositler gibi birçok farklı hücre grubunun EMT yoluyla doku ve organ fibrozisine neden olabileceği gösterilmiştir (Zeisberg ve diğerleri, 2007).

2.7. EMT ve Kanser

2.7.1. EMT- tümör progresyonu

EMT'yi tetikleyen Snail, Twist, Zeb-1 gibi transkripsiyon faktörleri embriyonik faktörler olmalarına karşın, kanserlerde sıklıkla yeniden aktive olmaktadır. Pro-metastatik faktörler olarak tanımlanan EMT proteinlerinin, RB ve P-53 bağımlı tümör supresör genleri baskılayarak, hücrelerin apoptozisten kaçmalarına yol açtığı ve hücrelerin bir dizi stres faktörünün etkisine rağmen çoğalmalarını sağlayarak, invazyon ve metastazı indükledikleri gösterilmiştir. Snail transkripsiyon faktörünün, E-kadherin promoter bölgesine bağlanarak ekspresyonunu bloke ettiği, ve EMT sürecinde anahtar rol oynadığı belirtilmiştir (Thiery, 2003).

Birçok in vitro kanser modelinde EMT sürecinin tümör progresyonunda belirgin rol oynadığı ortaya konmuştur. Ancak klinik olarak kanserli insan dokularında EMT'nin rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Tümörün invaziv yüzünde tümör kitlesinden ayrılan kordlar ve küçük agregatlar halindeki tümör hücrelerinin, invazyon sürecinde EMT'nin rol aldığı morfolojik öne sürülmektedir (Prall, 2007). Kolon kanserlerinde tümörün invaziv yüzünde E-kadherin ekspresyonunu kaybetmiş migratuvar tümör hücrelerinin varlığı gösterilmiştir (Yang ve diğerleri, 2006). Yine papiller troid karsinom, meme kanseri, servikal kanser gibi diğer solid tümörlerde invazyon alanlarında EMT ekspresyon profili (E-kadherin + /

vimentin -) sergileyen hücrelerin olduğu belirtilmiştir. Snail ekspresyonu, meme, kolorektal ve over kanserlerinde kısa yaşam süreleri, nüksler ve kötü klinik tablo ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca EMT profilinin daha kötü prognoza sahip tümör subtipleri (örneğin bazal hücreli ve metaplastik meme kanseri gibi) ve klinikopatolojik parametrelerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Geradts ve diğerleri, 2011).

Baş-boyun kanserlerinde, EMT aktivasyonunda önemli rol oynayan Snail ekspresyonunun moleküler prognostik bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür. Artmış Snail ekspresyonunun, E-kadherin'i baskılayarak; EMT programını ve baş-boyun kanserlerinde agresif davranışı tetiklediği bildirilmiştir. (Mendelsohn ve diğerleri, 2012). SHK'larda invazyon sürecinde EMT ile birlikte, podoplanin aracılı aktin remodelasyonunun da etkili olduğu bildirilmiştir (Wicki ve Christofori, 2006). Sonuç olarak EMT bağımlı ve EMT bağımsız invazyonun eş zamanlı gerçekleştiği düşünülmektedir.

Karsinogenesizde, EMT'nin rolü en çok invazyon ve metastaz gelişiminde ortaya konmuş olsa da; apoptosis, immünsüpresyon, inflamasyon ve tedaviye direnç gibi olaylarda da araştırılmaktadır. Farklı hücre serileri üzerinde yürütülen in vitro çalışmalar, TGF-beta ile muamele edildiklerinde hücrelerin EMT sürecine girdiklerini göstermiştir. TGF-beta, Snail ekspresyonunu kuvvetli şekilde uyararak hücreleri EMT sürecine sokmaktadır. Ras-ekspres eden hücreler TGF-beta ile uyarıldığında hücrelerin EMT sürecine girerek apoptozise direnç geliştirdikleri izlenmiştir (Valdes ve diğerleri, 2002). Snail, Twist 1 ve Twist 2 gibi EMT transkripsiyon faktörleri p16 ve p21'i inhibe ederek hücrelerin senesensde kalmalarını engellemektedir. Bütün bu mekanizmalar, EMT'nin senesens ve apoptozisi baskılayarak karsinogenesizde rol aldığını desteklemektedir (Ansieau, 2008).

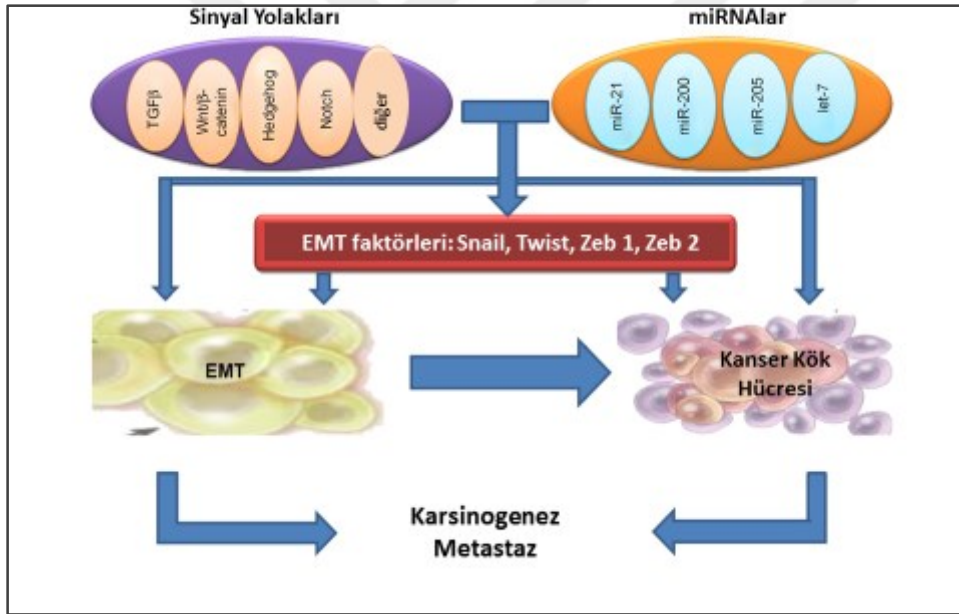
Snail aktivasyonu ve EMT sürecinin yalnızca invazyonda değil, immünsüpresyon ve immünrezistan mekanizmalar yoluyla konağın tümöre karşı verdiği yanıtı modifiye edebileceği bildirilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde Snail ekspresyonunun immünsüpresif sitokinlerin aktivasyonuna neden olduğu ve sitotoksik T lenfositlere karşı direnç gelişmesine yol açtığı gösterilmiştir (Kudo-Saito, 2006).

İnflamasyonun, tümör progresyonu ve fibrozisle ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, bu ilişkide EMT yoluyla indüklenen inflamasyonun önemli rolü olduğuna işaret etmektedir (Lopez-Novoa ve Nieto, 2009). Tümör mikroçevresinde ve organ

fibrozisinde farklı sinyal yolları sonucu indüklenen NF- κ B'nin, Snail ekspresyonunu transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde artırarak EMT'yi tetiklediği birçok çalışmada gösterilmiştir (Wu ve Bonavida, 2009).

2.8. EMT ve Kanser Kök Hücre

Son bilimsel araştırmalar, EMT sürecine giren hücrelerin, kanser kök hücre özelliklerini kazanabildiğini desteklemektedir (Polyak ve Weinberg, 2009) (Resim 2.2). EMT programının aktivasyonu, hücrelerin kendini yenileyebilme ve limitsiz diferansiyasyon yeteneği kazanmalarına yol açmaktadır (Mani ve diğerleri, 2008). Bu nedenle EMT'nin, kanser kök hücreleri ya da tümörögenезisi başlatan hücreleri meydana getiren bir farklılaşma süreci olduğu düşünülmektedir.



Resim 2.2. EMT-kanser kök hücre etkileşimi

In vitro koşullarda, insan embriyonik kök hücre agregatlarının periferindeki hücrelerde EMT bulguları izlenmiştir. Bu hücrelerin mezenşimal fenotip geliştirdiği; Snail, vimentin ve MMP-9 eksprese ettikleri gösterilmiştir. Ek olarak bu hücreler OCT-4 ve Nanog gibi totipotent transkripsiyon faktörlerini de üretmektedir. Bu bulgular, EMT sürecine giren hücrelerin mezenşimal fenotip kazanmalarının yanısıra pluripotent özellikleri de geliştirdiğini desteklemektedir (Eastham ve diğerleri, 2007).

Meme kanseri ve nazofaringeal kanserlerde EMT aktivasyonunun, farklılaşmış hücelere kök hücre özellikleri kazandırdığı gösterilmiştir (Ansieau, 2013). İn situ duktal karsinomlarda, sıklıkla Snail ve Twist1 gibi EMT aktivatörlerinin, uzak metastaz görülmeden çok önce belirlendiği bildirilmiştir (Geradts ve diğeri, 2011).

Memeli epitel hücrelerinde EMT süreci, TGF-beta gibi büyüme faktörleri yoluyla ya da Twist, Snail, Zeb-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ile tetiklenmektedir. (Thiery ve Sleeman, 2006). İn vitro koşullarda, memeli epitel hücrelerinin yüksek TGF-beta ve Snail ekspresyonu sonucu 12. günde kanser kök hücre (CD44+/CD24-) özellikleri kazandığı gösterilmiştir (Mani ve diğeri, 2008). Meme kanseri hücrelerinde bu yolların aktivasyonu, hücrelerde invaziv ve metastatik potansiyel kazanmalarına ve eş zamanlı olarak kanser kök hücre fenotipi geliştirmelerine yol açmıştır.

Dil kökenli SHKdan izole edilen insan SCC9 hücre serisi kullanılarak gerçekleştirilen bir in vitro çalışmada, artmış Snail ekspresyonunun bu hücelere invaziv ve metastatik özelliklerin yanısıra düşük proliferasyon, kendini yenileyebilme ve koloni oluşturma gibi kanser kök hücre özellikleri kazandırdıkları gösterilmiştir. Snail ile mumele edilen hücrelerin CD24 negatif, CD44 pozitif olduğu; CD133 açısından kontrol grubu hücreleriyle anlamlı farklılık olmadığı belirtilmiştir (Zhu ve diğeri, 2012). Yaptığımız literatür incelemesinde oral displazi ve oral kanserde Snail ekspresyonu ve kanser kök hücre ilişkisini inceleyen klinik bir çalışmanın bulunmadığı görülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Retrospektif olarak planlanan çalışmamız 2005-2015 yılları arasında Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı'nda “*Epiteliyal hiperplazi*”, “*Epiteliyal Displazi*” ve “*Skvamöz Hücreli Karsinom*” tanısı almış tanı sonrası imha edilecek dokular üzerinde yürütülmüştür

3.1. Çalışma Materyalinin Seçimi

Gazi Üniversitesi Oral Patoloji Anabilim Dalı arşiv materyalinde, 2005-2015 yılları arasında “*Epiteliyal Hiperplazi*”, “*Epiteliyal Displazi*” ve “*Skvamöz Hücreli Karsinom*” tanıları taranarak, çalışmaya uygun blok ve camlar elde edildi. Çalışmaya dahil edilen bloklarda immünohistokimyasal ve moleküler analizler için yeterli miktarda doku bulunmasına dikkat edildi. Bu kriterler gözetilerek çalışmaya 23 adet displazi, 16 adet skuamöz hücreli karsinom ve 19 adet epitelial hiperplazi olmak üzere toplam 58 adet parafine gömülü doku örneği dahil edildi. “*Epiteliyal Hiperplazi*” tanısı alan doku örnekleri kontrol grubunu oluşturdu.

3.2. Histolojik Ön Değerlendirme ve Derecelendirme

Vakalara ait tüm hematoksilen-eozin boyalı preparatlar ışık mikroskobu altında üç araştırmacı tarafından incelenerek değerlendirildi. “*Epiteliyal hiperplazi*” tanısı alan örneklerde iltihabi hücre infiltrasyonu “hafif”, “orta”, “ağır” olmak üzere sırasıyla 1, 2 ve 3 skorları ile derecelendirildi.

“*Skvamöz hücreli kanser*” tanısı alan örnekler DSÖ kriterleri göz önüne alınarak “az”, “orta” ya da “iyi” diferansiye olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırmanın yanı sıra, tümör stromasındaki iltihabi infiltrasyonun natürü ve izlenebiliyorsa sub-mukozaya infiltrasyon olup olmadığı; lenfoid agregat varlığı; tümöre komşu alanlarda displastik epitel varlığı değerlendirildi. Tümör stromasındaki iltihabi infiltrasyon “hafif”, “orta”, “ağır” olmak üzere sırasıyla 1, 2 ve 3 skorları ile derecelendirildi (Watanabe, Petro, Shlimon ve Unterman, 2008).

“Displazi” tanısı alan örnekler ise iki farklı sınıflandırma kullanılarak derecelendirildi.

DSÖ sınıflaması:

DSÖ tarafından 1997’de yayınlanan ve bütün dünyada altın standart olarak kullanılan “Oral mukozada kanser ve prekanserin histopatolojik sınıflandırması”dır. Buna göre displastik lezyonların karsinoma dönüşmesinde lezyonlar “hafif displazi”, “orta dereceli displazi”, ağır displazi” ve “karsinoma in situ” olmak üzere 4 kategoriye ayrıldı. “İn situ karsinom” epiteliyal displazinin en üst basamağını temsil eden pre-invaziv malignansi olarak değerlendirildi.

Kujan ve diğerleri, (2007)’nin tanımladığı “Binary system” sınıflaması:

DSÖ’nün displazi kriterleri kullanılarak epiteliyal displazileri “düşük risk” ve “yüksek risk” olmak üzere kategorize eden iki aşamalı bir sistemdir. Displazinin derecelendirilmesinde kullanılan kriterler yapısal ve sitolojik olarak iki grupta toplanabilir. Buna göre “yüksek risk” lezyonlar için cut-off değeri en az 4 yapısal kriter ve 5 sitolojik kriterin birarada olması şeklinde belirlenmiştir (Gale, 2005). Her displastik örnek, bu kriterler gözetilerek skorlandı ve “düşük dereceli” ya da “yüksek dereceli” olacak şekilde iki alt gruba ayrıldı.

3.3. İmmünohistokimyasal Analiz

Parafine gömülü doku örneklerinden immünohistokimyasal boyama işleminde kullanılmak üzere 4µ kalınlığında 4er adet adhezivli cama histolojik kesitler alındı. Kanser kök hücreleri için CD133 (rabbit polyclonal, Proteintech Europe) ve CD44 (Leica, NCL-CD44-2 mouse monoclonal, df1485 New Castle, United Kingdom) ve EMT için Snail (rabbit polyclonal, Thermo Scientific) ve E-kadherin (Leica, mouse monoclonal, 36b5 New Castle, United Kingdom); primer antikorları olmak üzere dört adet primer antikor kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyamalar, VENTANA BENCHMARK X otomatik cihazı (Ventana Medical Systems, Inc.1910 E. Innovation Park Drive Tuscon, Arizona, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Boyama Asamaları:

Deparafinizasyon:

- 65°C etüvde 30 dk. bekletildi.
- 5'er dk. İki ayrı ksilenden geçirildi.
- 5'er dk. İki ayrı alkolden geçirildi.
- Lamlar cihaza yerlestierek çalışma başlatıldı.
- Cihaz ek deparafinizasyon aşamaları uyguladı.

Antijen elde etme (Antigen Retrieval):

Tüm antikorlar için bu aşamada antijen retrieval işlemi için EDTA kullanıldı. Uygulama süresi CD133 için 30 dak., CD44 için 60 dak. , Snail için 30 dak. ve E-kadherin için 60 dak olarak belirlendi.

Antikor damlatma ve titrasyon:

- Antikorlar tavsiye edilen oranlarda PBS ile sulandırıldı. Optimal dilüsyon oranları CD133, CD44 ve E-kadherin, için 1/100; Snail için 1/50 olarak belirlendi.
- Damlatma işlemi her bir lama 100ml olarak, manuel gerçekleştirildi.
- Titrasyon işlemi, yine önceden cihaza kaydedilmiş olan protokoller uyarınca, süre ve sıcaklık değerleri gözetilerek cihaz tarafından uygulandı. Titrasyon süreleri CD44, CD133, Snail ve E-kadherin için sırasıyla 48 dakika; 44 dakika; 36 dakika ve 40 dakika olarak uygulandı.

Kit uygulama:

Cihaz bu asamada antijen-antikor kompleksi oluşturmak için gerekli ikincil kimyasalları ve gereksiz bağlanmaları engellemek için de H₂O₂ uyguladı.

Zemin boyama (Counterstaining):

- Antikor ile işaretli hücreler dışında kalan hücrelerin boyanmasıdır.
- Gill's Hematoxylin (Ventana) cihaza kaydedilen protokol uyarınca 8 dakika süreyle uygulandı.

Zıt zemin boyama (Post-Counterstaining):

- Zemin boyamada kullanılan boya rengini açmak ve antikor isaretleyici DAB ile kontrast oluşturmak için uygulandı.
- “Bluing Reagent” (Ventana) cihaza kaydedilen protokol uyarınca 4 dakika süreyle uygulandı.

Dehidratasyon ve kapama:

- Lamlar cihazdan alındı ve sabunlu suyla yıkandı.
- 5'er dk. İki ayrı alkolden geçirildi.
- 5'er dk. iki ayrı ksilenden geçirildi.
- Entellan yardımıyla lamelle kapatıldı.

İmmünreaktivitenin değerlendirilmesi: İmmünohistokimyasal değerlendirme ışık mikroskopunda, x200 büyütmede, SHK olgularında tüm tümör alanını; EH ve displazi olgularında ise tüm epiteliyal alanı dikkate alarak gerçekleştirildi.

Snail ekspresyonu değerlendirilirken; yalnızca nükleer boyanma pozitif kabul edildi. Pozitif boyanan hücrelerde hem yoğunluk, hem de yaygınlığın birlikte değerlendirildiği H skorlaması yapıldı (Zhao ve diğerleri, 2012). H skor değeri = Boyanan hücre yoğunluğu x Pozitif hücrelerin oranı ile elde edildi; ve 1-3 arasında skorlandı. Boyanma yoğunluğu yok=0, hafif=1, orta=2 ve şiddetli=3 olacak şekilde değerlendirildikten sonra, pozitif olan hücrelerin oranı belirlendi. Boyanmanın yaygınlığı boyanan hücre yüzdesine göre; 0 (%1'den az), 1 (% 1-40), 2 (% 40-80), 3 (% 80'den yüksek) belirlenerek yoğunluk skoruyla çarpıldı. H skoru 1, 2 ve 3 olanlar, 1; 4-6 olanlar 2; 6-9 olanlar 3 skoru aldı. Pozitif kontrol dokusu olarak meme invaziv duktal karsinom kullanıldı.

Çizelge 3.1. Snail immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

Boyanma yoğunluğu	Boyanma yaygınlığı	H skor (boyanma yoğunluğu x yaygınlığı)	Skor
0	%1'den az (0)	0	0
1	% 1-40 (1)	1-2	1 (zayıf)
2	% 40-80 (2)	3-4	2 (orta)
3	%80'den çok (3)	6-9	3 (güçlü)

E-kadherin ve CD44 için yalnızca membranöz boyanma pozitif kabul edildi. E-kadherin için skorlama şu şekilde yapıldı: Boyanmanın yaygınlığı boyanan hücre yüzdesine göre; 0, hiç boyanma yok; 1 (%10'dan az), 2 (%10-75), 3 (%75'den yüksek) olarak belirlendi. CD44 için skorlama şu şekilde yapıldı: Boyanmanın yaygınlığı boyanan hücre yüzdesine göre; 0, (%10'dan az), 1 (%10-50), 2 (%50'den yüksek) olarak belirlendi. E-kadherin için pozitif kontrol dokusu olarak sağlıklı oral mukoza, CD44 için ise kolon kullanıldı.

Çizelge 3.2. E-kadherin ve CD44 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

Boyanma yaygınlığı	E-kadherin Skoru	Boyanma yaygınlığı	CD44 Skoru
Hiç boyanma yok	0	% 0-10	0
% 1-10	1	% 10-25	1
% 10-75	2	% 25-50	2
% 75'den çok	3	% 50'den çok	3

CD133 için membranöz ve sitoplazmik boyanma pozitif kabul edildi. Hücrelerin % 5'den azı boyandığı durumlar negatif kabul edildi. Skorlama boyanmanın yaygınlığı boyanan hücre yüzdesine göre değerlendirilerek belirtilen şekilde gerçekleşti: 0, % 5'den az hücre boyanması; 1, % 5-50; 2, % 50'den fazla hücre boyanması. Kolon, pozitif kontrol dokusu olarak kullanıldı.

Çizelge 3.3. CD133 immünreaktivitesinin değerlendirilmesi

Boyanma yaygınlığı	CD133 skoru
% 5'den az	0
% 5-50	1
% 50'den çok	2

3.4. Moleküler Analiz

Çalışma grubunu oluşturan örneklerde EMT belirteçlerinden Snail ve kanser kök hücre belirteçlerinden CD133 ekspresyon değişiklikleri moleküler düzeyde RT-qPCR yöntemi uygulanarak değerlendirildi.

Moleküler analizler için: Parafine gömülü doku örneklerinden 10µ kalınlığında toplam 3 kesit alınarak daha önceden steril edilen eppendorf tüplere aktarıldı ve tüpler kodlandı. Sırası ile deparafinizasyon, RNA izolasyonu, RNA miktarının ölçülmesi, cDNA eldesi ve RT-qPCR gerçekleştirildi.

Deparafinizasyon: Doku örneklerinin bulunduğu Eppendorf tüplere 800 µl ksilen eklenerek 7000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu basamak iki kez tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra, 400 µl %100'lük alkol eklenerek 7000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. 1 ml %100'lük etanol eklendi. Kısa vorteks işleminden sonra 2 dakika boyunca 7000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu basamak iki kez tekrarlandı. 55°C'de eppendorf tüplerin kapakları açık olarak 10 dakika boyunca bekletildi.

RNA izolasyonu: Deparafinizasyonu takiben RNA izolasyonu High Pure FFPE RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. RNA izolasyon aşamaları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- Her bir örneğe 100 µl RNA doku liziz tamponu, 16 µl %10'lük sodyum dodesil sülfat solüsyonu ve 40 µl "Proteinaz K enzim solüsyonu eklenerek vortekslenildi.
- Kısa spin işleminden sonra 85°C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi.
- 50°C'ye soğutulduktan sonra 80 µl proteinaz K eklendi. Vortekslenerek kısa spin verildi.
- 30 dakika boyunca 55°C'de çalkalamalı kuru sıcak blokta inkübe edildi. Doku lizatları berrak hale gelene kadar inkübasyon süresi uzatıldı.
- Doku lizatları kit içerisinde bulunan filtrelili tüplere aktarıldı.
- 325 µl RNA bağlama tamponu ve 325 µl etanol (%100'lük) eklendi. Vortekslenerek kısa spin verildi.
- Filtrelili tüpler yeni toplama tüpleri içine alındı. Lizatlar yeni tüplere aktarıldı. 30 sn 15.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Filtrelili tüpler yeni toplama tüpleri içine alınarak, 16.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Her tüpe kit içerisinde hazır bulunan DNAaz solüsyonundan 100µl eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra 500 µl I. Yıkama tampon solüsyonu eklendi. 15.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüplerindeki sıvı atıldı. Bu yıkama işlemi II. Yıkama tampon solüsyonu eklenerek iki kez tekrarlandı.
- 15.000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra, filtrelili tüpler 1,5 ml'lik Eppendorf tüplere aktarıldı.
- 50 µl "RNA elusion tampon" filtrenin merkezine eklendikten sonra 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 15.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra örneklerden RNA eldesi gerçekleşti.

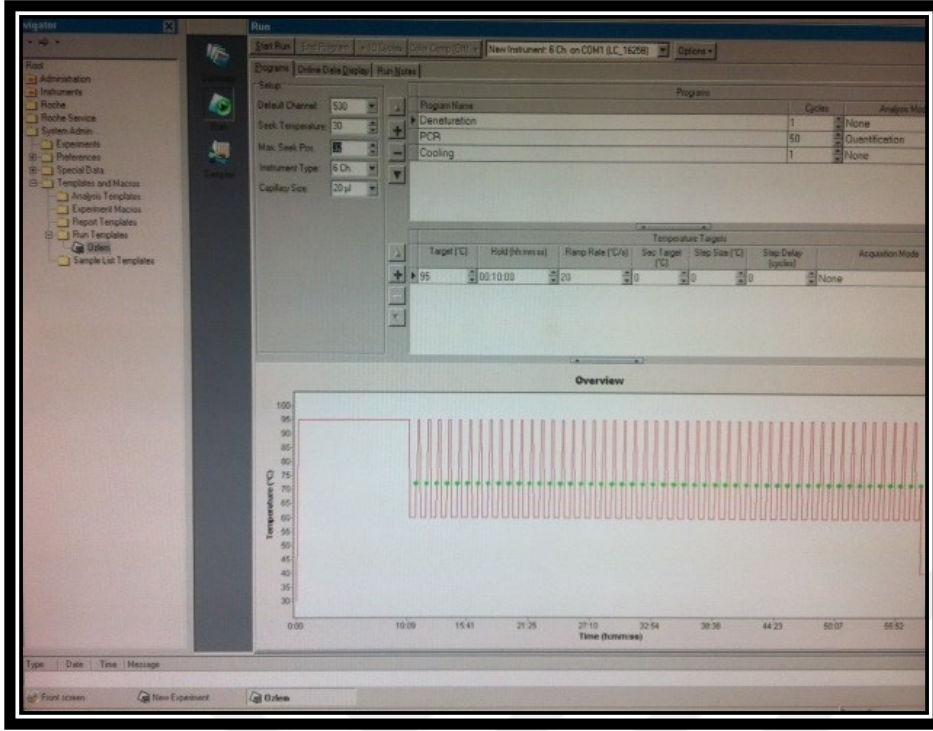
RNA miktarının belirlenmesi: RNA ekstraksiyonunu takiben RNA konsantrasyonu spektrofotometre (PROMEGA QuantusFluorometer) ve cihaza ait kit (PROMEGA E3310 Quantiflour RNA System, 1ml) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen RNA örnekleri kodlanarak cDNA sentezi yapılana kadar -80°C 'de derin dondurucuda saklandı.

cDNA sentezi: Her örnekten 9.4 μl RNA kullanılarak mikro-kolon içeren hazır kitler (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) yardımıyla cDNA'ya revers transkripsiyon gerçekleştirildi. cDNA sentezi aşamaları aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

- 1 μl random primer ve 1 μl oligo primer eklenerek primer karışımı (mix) hazırlandıktan sonra, 9.4 μl RNA eklendi.
- Termal Cycler (Thermo-Hybaid PCR) cihazında 65°C 'de 10 dakika inkübe edildikten sonra buza konularak soğutuldu.
- Her bir örnek için 4 μl "Revers Transkriptaz tampon", 0,5 μl "RNAaz inhibitör", 2 μl "DNTP solüsyonu", 1 μl "DTT solution" ve 1 μl "Revers Transkriptaz solüsyonu" eklenerek master miks hazırlandı.
- Her RNA primer karışım tüpüne tüpe 8.6 μl master mix eklenerek 55°C 'de 30 dakika ve 85°C 'de 5 dakika olmak üzere kuru sıcak blokta inkübe edildi. Buza konuldu.
- Elde edilen örnek başına toplam 20 μl cDNA -20 derecede saklandı.

RT-qPCR

mRNA ekspresyonu, real time RT-qPCR LightCycler-16258 (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) cihazı kullanılarak ölçüldü. PCR reaksiyon hacmi 5 μl cDNA, 1 μM her bir primer, 10 μl "2x PCR probes master" (Light Cycler 480 probes master, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) ve 4 μl H₂O olmak üzere toplam 20 μl olarak hazırlandı ve kapiller tüpler içinde cihaza yerleştirildi. PCR şartları 95°C 'de 10 dakika denatürasyonu takiben, 60°C 'de 30 sn ve 72°C 'de 1 sn olmak üzere 50 döngü "sayım" ve 40°C 'de 30 sn. "soğutma" olarak programlandı.



Resim 3.1. RT-PCR koşulları

PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir:

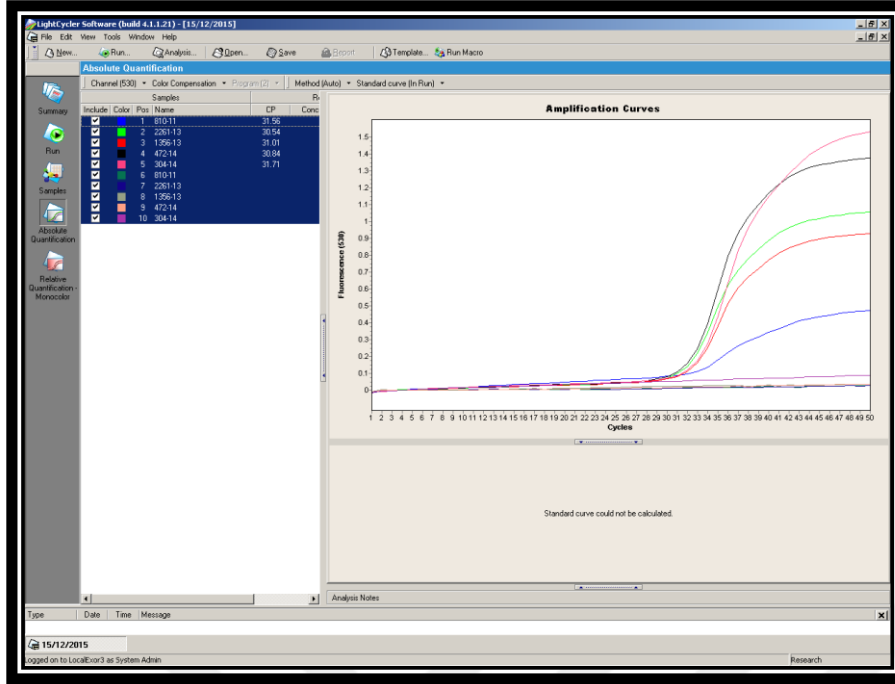
Snail (LOT 90017736, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) için:

- Forward primer dizisi “TGCAGGACTCTAATCCAAGTTTACC”
- Reverse primer dizisi “GTGGGATGGCTGCCAGC”

CD133 (LOT 90017737, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) için:

- Forward primer: “TTTCAAGGACTTGCGAACTCTCTT”
- Reverse primer: “GAACAGGGATGATGTTGGGTCTC”

Referans gen olarak her reaksiyonda Actin (ACTB, LOT 0000001025 Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanıldı. Her RT-PCR protokolünde negatif kontrol kullanıldı. Her örnek için hedef gen (Snail, CD133) ve referans gene (Aktin) ait “quantification PCR cycle (Cq)” değerleri ve amplifikasyon eğrileri kaydedildi.



Resim 3.2. Hedef gen (snail) ve referans gene (β aktin) ait amplifikasyon eğrileri

Hedef genlerin (Snail, CD133) referans gene oranla ekspresyonları ve örnekler arası farklılıklar relatif olarak " $\Delta\Delta Cq$ " metodu ile hesaplandı. Kontrol grubundan bir örnek "kalibratör" olarak seçildi (Bustin ve diğerleri, 2009).

- $\Delta Cq1 = Cq$ (Hedef gen -örnek) – Cq (Referans gen-örnek)
- $\Delta Cq2 = Cq$ (Hedef gen-kalibratör) – Cq (Referans gen kalibratör)
- $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq1$ (örnek) – $\Delta Cq2$ (kalibratör)
- Relative Quantification (Normalize edilmiş gen ekspresyon düzeyi) = $2^{-\Delta\Delta Cq}$

3.5. İstatistiksel Analiz

Veriler IBM SPSS Statistics 23 paket programlarına aktarılarak analizler tamamlandı. Kategorik değişkenler için sıklık analizi (n, %), sürekli değişkenler için ise tanımlayıcı istatistikler verildi.

Çalışmamızda $n < 30$ olduğu için parametrik olmayan istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. İki bağımsız grup arasındaki farklılık incelenirken Mann Whitney U, ikiden fazla bağımsız grup arasındaki fark incelenirken ise Kruskal Wallis testi kullanıldı. Sürekli değişkenler arasındaki ilişki incelenirken Spearman's Rho korelasyon katsayısı kullanıldı. İki kategorik değişken arasındaki ilişki ise ki kare ile belirlendi.



4. BULGULAR

4.1. Hasta Demografik Bilgiler

Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı'nda 2005-2015 yılları arasında "Epiteliyal Hiperplazi", "Displazi" ve "Skvamöz Hücreli Karsinom" tanısı alan toplam 58 olgu üzerinde yürütüldü. EH grubuna 19, Displazi grubuna 23; SHK grubuna 16 olgu dahil edildi.

Tüm olgulara ait demografik veriler, Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de verildi. Ortalama hasta yaşı 54,02 (20-90)'dir. Displazi grubunda kadın sayısı daha fazla iken, SHK ve EH gruplarında ki olgular erkek ağırlıklıdır. Ortalama yaş ve cinsiyet dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı (Şekil 4.1, 4.2).

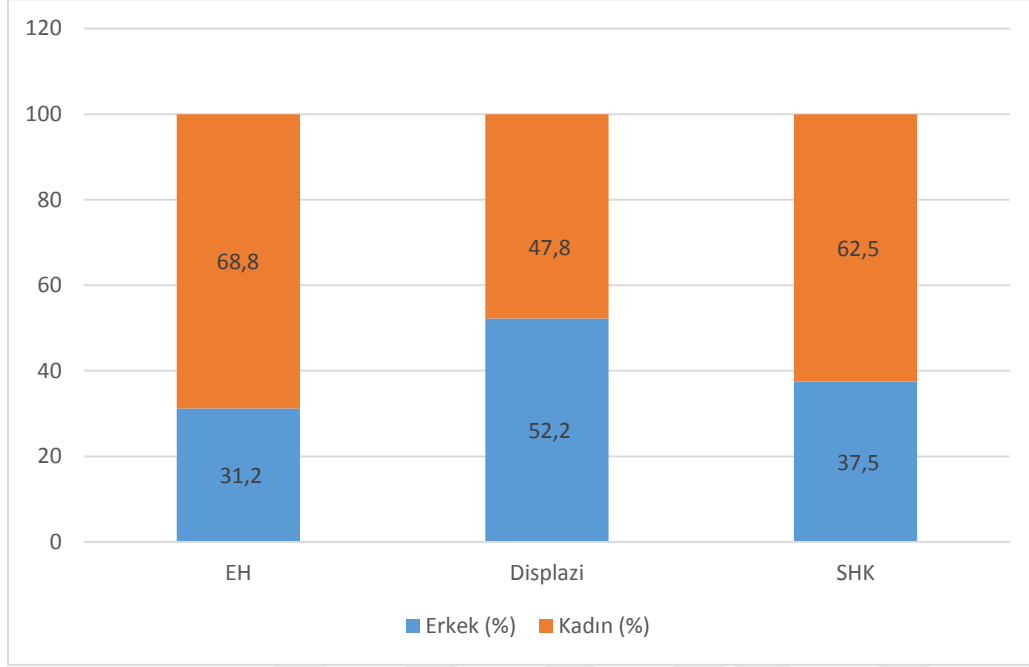
Çizelge 4.1. Klinik ve demografik veriler

	N	%
EH	19	32,7
Displazi	23	39,7
SHK	16	27,6
Cinsiyet		
Erkek	26	44,8
Kadın	32	55,2
Lokalizasyon		
Ağız Tabanı	4	6,9
Bukkal Mukoza	13	22,4
Dil	8	13,8
Maksilla	15	25,9
Mandibula	18	31,0
	Ortalama±SS	Minimum-Maksimum
Yaş	54,02±15,33	20-90

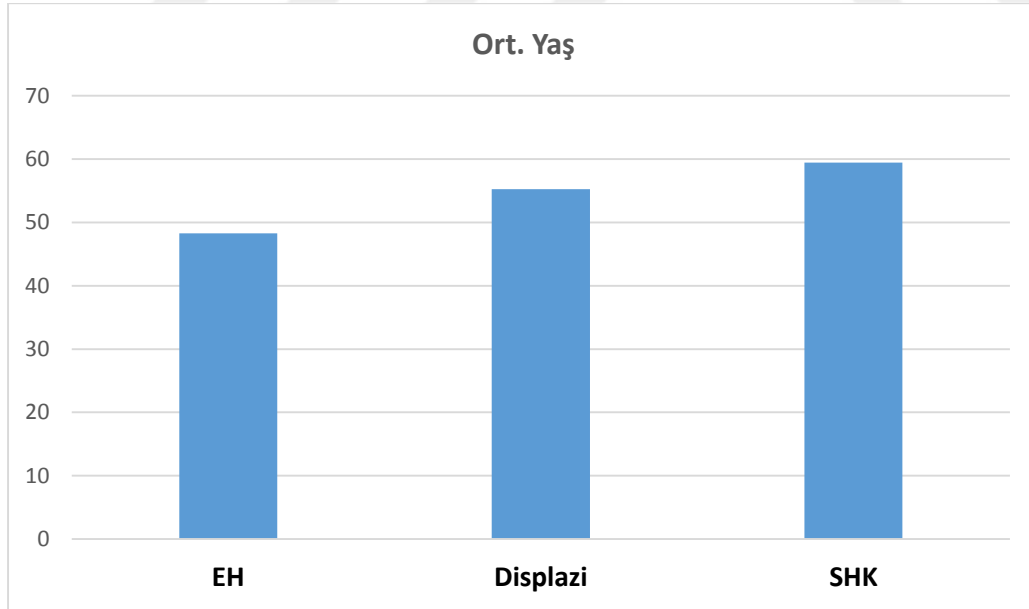
Çizelge 4.2. Klinik ve demografik verilerin gruplara göre dağılımı

	EH N=19		Displazi N=23		SHK N=16	
	N	%	N	%	N	%
Cinsiyet						
Erkek	8	42,1	12	52,2	6	37,5
Kadın	11	57,9	11	47,8	10	62,5
Lokalizasyon						
Ağız Tabanı	0	0,0	2	8,7	2	12,5
Bukkal Mukoza	4	21,1	5	21,7	4	25,0
Dil	1	5,3	4	17,4	3	18,8
Maksilla	5	26,3	7	30,4	3	18,8
Mandibula	9	47,4	5	21,7	4	25,0
	Ortalama±SS	Min.-Mak.	Ortalama±SS	Min.-Mak.	Ortalama±SS	Min.-Mak.
Yaş	48,27±14,28	20-75	55,22±15,42	26-80	59,46	37-90±15,07

Her üç grup için olgulara ait anatomik yerleşimlerin dağılımı Şekil 4.4., Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 da gösterilmiştir.

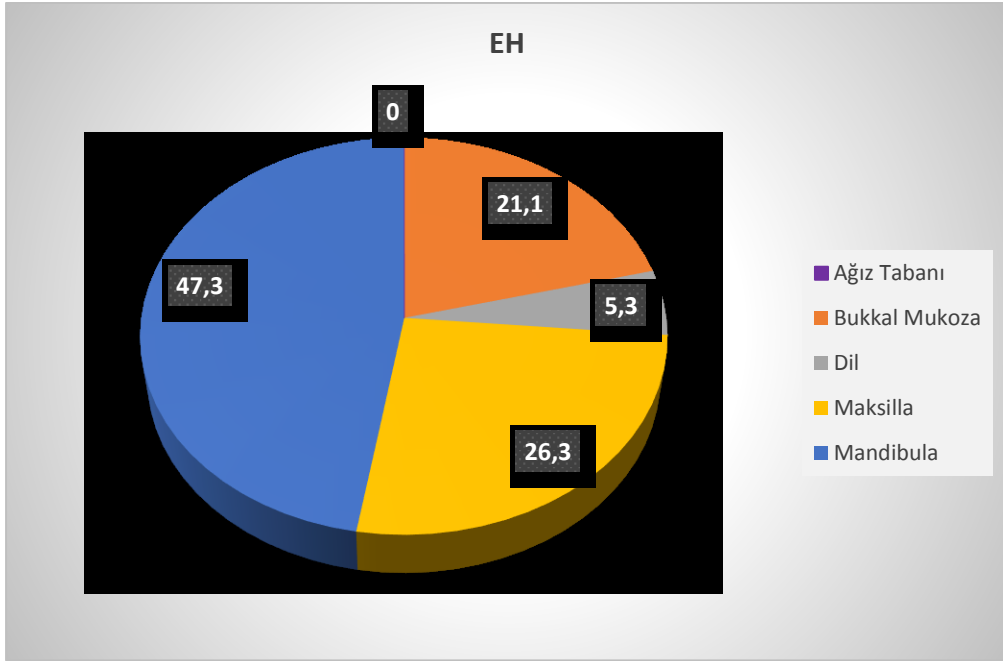


Şekil 4.1. Olgularda gruplara göre cinsiyet dağılımı

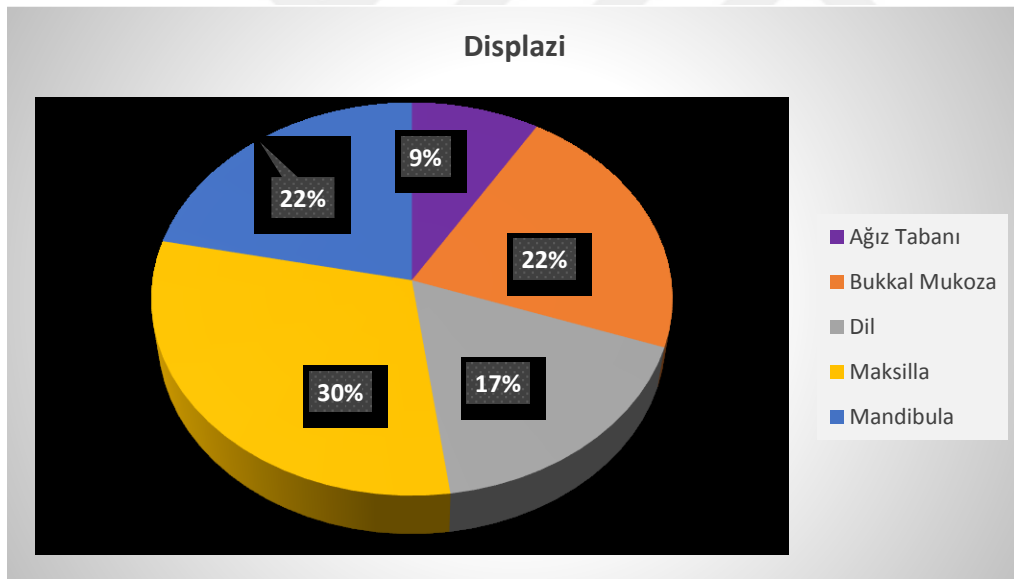


Şekil 4.2. Olgularda gruplara göre ortalama yaş değerleri

EH grubundaki olguların %42,1'i erkek ve %57,9'u ise kadındır. %21,1'inin lokalizasyonu bukkal mukoza iken %5,3'ünün dil, %26,3'ünün maksilla ve %47,4'ünün ise mandibuladır.

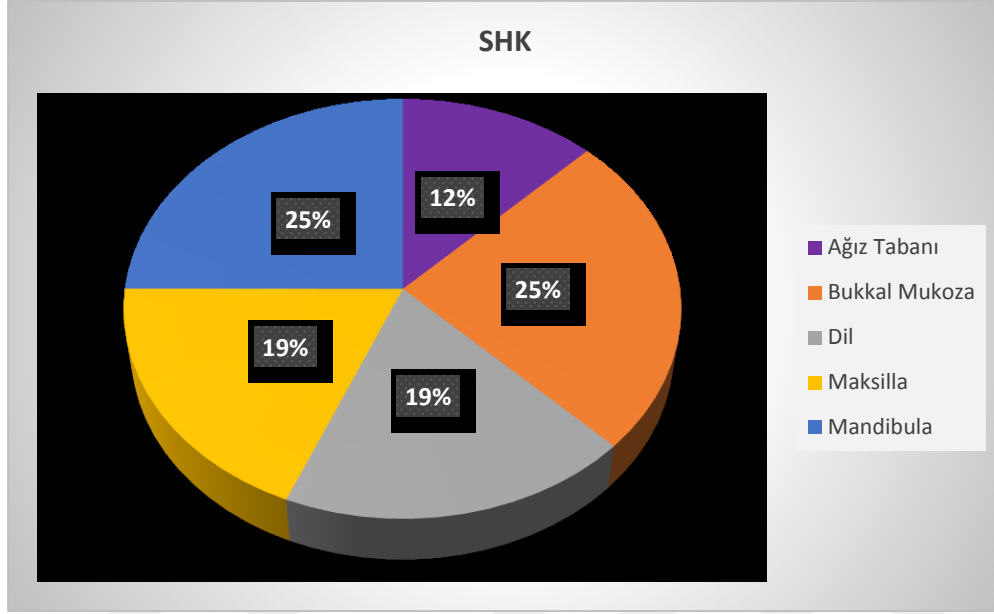


Şekil 4.3. Epitelial hiperplazi grubunda anatomik yerleşimlerin dağılımı



Şekil 4.4. Displazi grubunda anatomik yerleşimlerin dağılımı

Displazi grubunda lezyonların %8,7'sinin anatomik yerleşim yeri ağız tabanı iken %21,7'sinin bukkal mukoza, %17,4'ünün dil, %30,4'ünün maksilla ve %21,7'sinin ise mandibuladır. SHK grubunda ise lezyonların %12,5'inin anatomik yerleşim yeri ağız tabanı iken %25'inin bukkal mukoza, %18,8'inin dil, %18,8'inin maksilla ve %25'inin ise mandibuladır.



Şekil 4.5. Skuamöz hücreli karsinom grubunda anatomik yerleşimlerin dağılımı

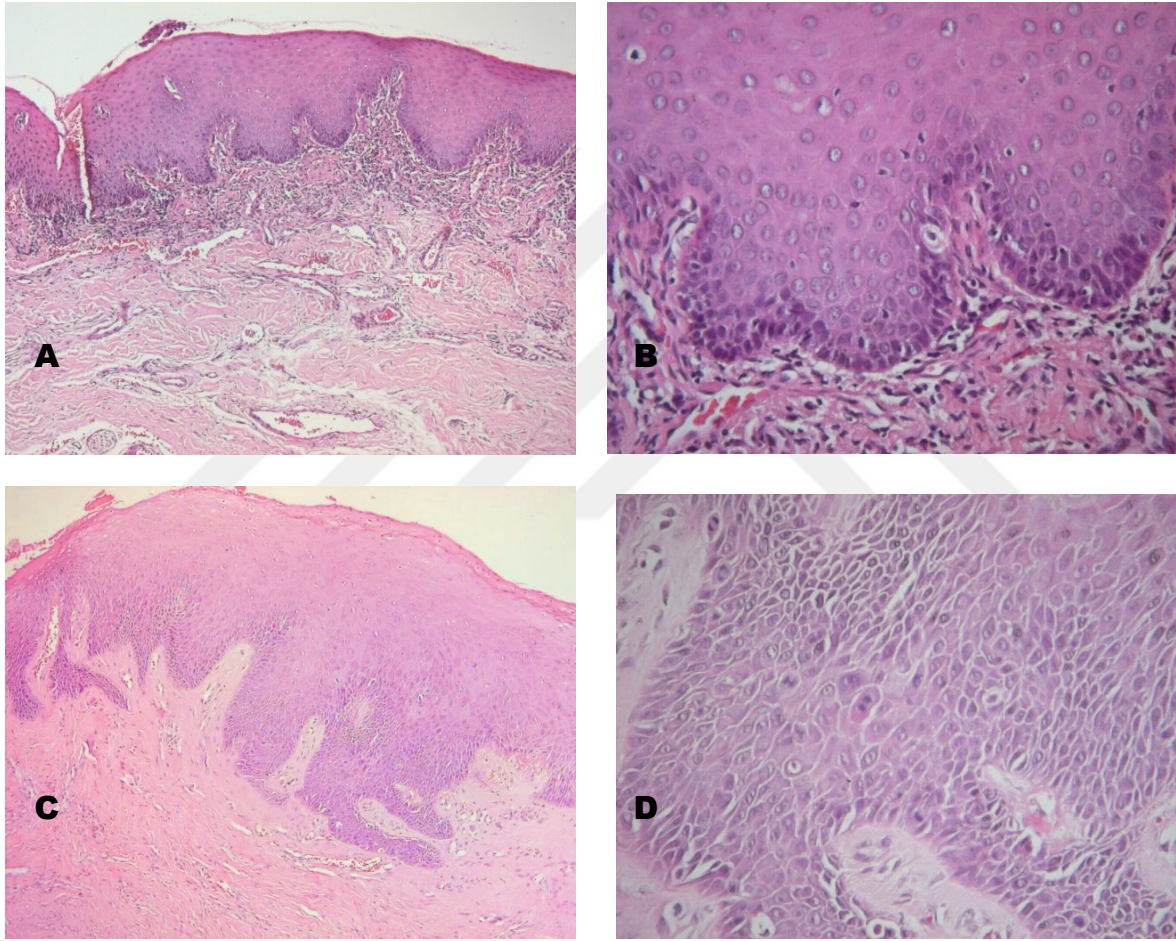
4.2. Histopatolojik Bulgular

Epiteliyal Hiperplazi: Histolojik değerlendirmede, yüzeysel parakeratinizasyon gösteren akantotik çok katlı yassı epitel ve kollajenize bağ dokusu izlendi. Skuamöz epitelin matür görünümde olduğu görüldü. Bazı olgularda subepiteliyal alanda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi.

Epiteliyal displazi: Histolojik olarak displazilerde, skuamöz epitelin, kısmen veya tüm katlarında hücre kalabalığı ve immatür görünümde olduğu izlendi. Epitelin bağ dokuya doğru tomurcuklanma tarzında uzantılar verdiği ve bazı olgularda rete proliferasyonunun geniş tabanlı ya da tüp şeklinde olduğu görüldü. Düşük dereceli displazilerde genellikle skuamöz epitelin bazal tabaka hücrelerinde polarite kaybı, baziller hiperplazi, hücresel pleomorfizm gibi özelliklerin daha az belirgin olduğu görüldü (Resim 4.1 A, B). Yüksek dereceli displazilerde bu kriterlerin sayıca arttığı ve bazı olgularda sitolojik atipinin daha baskın hale geldiği ve yükselmiş mitoz varlığı izlendi (Resim 4.1 C, D). Bazı olgularda subepiteliyal alanda bağ dokuda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu görüldü. Displazi tanısı alan 23 olgunun 9'u "düşük dereceli" (DD), 14'ü "yüksek dereceli" (YD) olarak sınıflandırıldı (Kujan ve diğerleri, 2007) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. SHK ve displazi olgularına ait histolojik derecelendirme

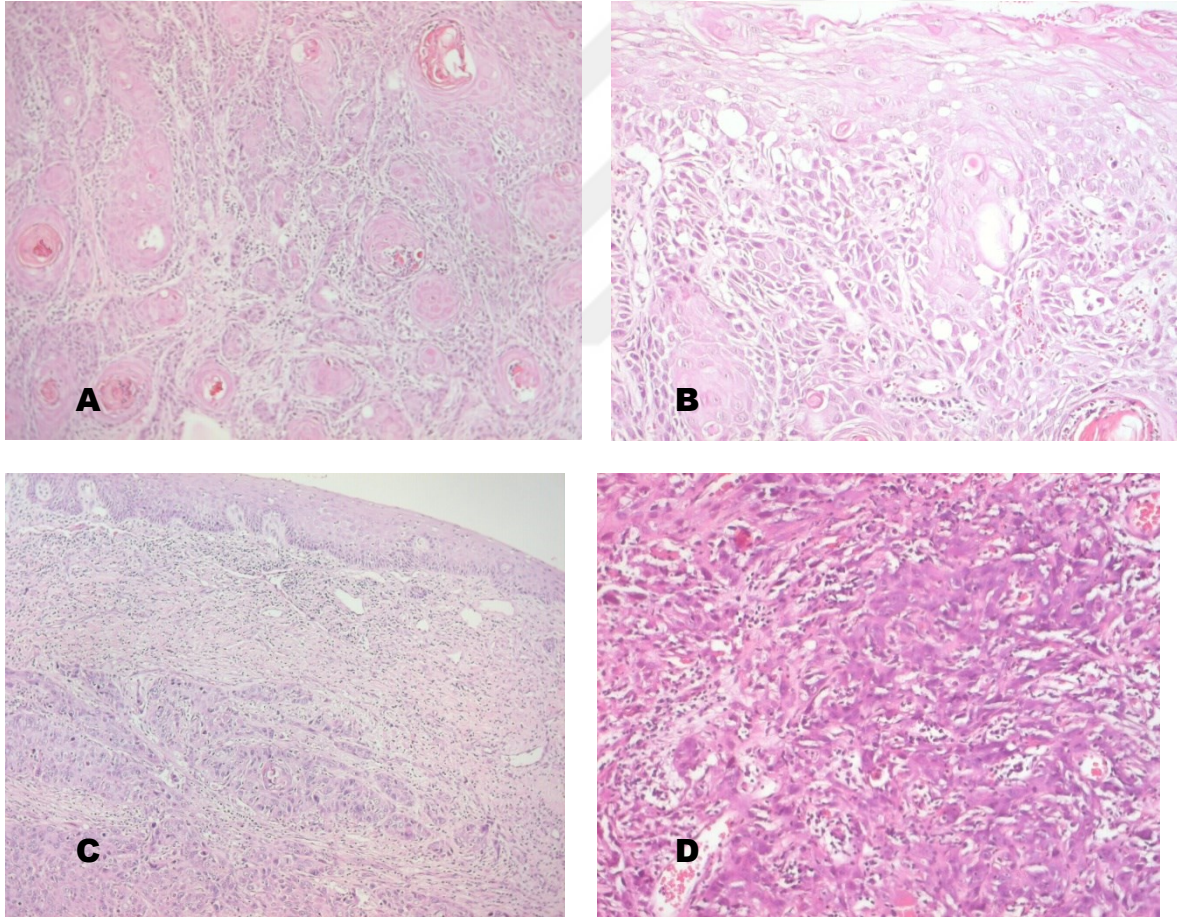
	N	%
Displazi Grubu		
DD	9	39,1
YD	14	60,9
SHK Grubu		
İyi	10	62,5
Orta	4	25,1
Az	1	6,3
Mikro İnvaziv	1	6,3



Resim 4.1. Displazi olgularında histopatolojik bulgular A) Displastik oral mukoza epiteli (DD) H&E, x100. B) Displastik oral mukoza epiteli (DD), bazal keratinositlerde polarite kaybı, H&E, x 200. C) Displastik oral mukoza epiteli (YD) H&E, x100. D) Hüresel pleomorfizm ve artmış mitotik aktivite gösteren displastik oral mukoza epiteli (YD) H&E, x200

SHK olgularında histolojik olarak, yüzey epitelinden alttaki bağ dokusuna doğru uzanan irili ufaklı adalar veya kümeler oluşturur şekilde yapılanmış, soluk eozinofilik geniş stoplazmalı ve belirgin nukleol içeren iri nukleuslu hücrelerin oluşturduğu invaziv tümöral gelişim izlendi. İyi diferansiye SHK'lerde bağ dokusunu infiltre eden tümör hücrelerinin merkezinde

sıklıkla keratin incileri görüldü (Resim 4.2 A, B). Orta dereceli SHK’lerde belirgin nükleer pleomorfizm ve mitotik aktivitenin yanısıra daha az keratinizasyon izlendi (Resim 4.2, C). Az diferansiye olarak derecelendirilen SHK olgusunda ise küçük hücre grupları ve kordlar şeklinde infiltrasyon alanları görülürken, bağ doku stroması ile belirgin sınırların kalktığı izlendi (Resim 4.2, D). Bazı olgularda tümörün çizgili kas ve minör tükürük bezi gibi anatomik yapıları invaze ettiği görüldü, ancak hiç bir vakada açıkça damar invazyonu saptanmadı. Olguların çoğunda stromada diffüz mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu görüldü (Resim 4.2, D). Çalışmaya dahil edilen, SHK tanısı alan 16 olgudan 10’u “iyi”; dördü “orta”, biri “az” diferansiye; biri ise “mikro invaziv” olarak derecelendirildi (Çizelge 4.3).



Resim 4.2. SHK olgularında histopatolojik bulgular A) İyi diferansiye SHK, H&E, x100. B) İyi diferansiye SHK, yüzey epiteliyle ilişkili, H&E, x200 C) Orta derecede diferansiye SHK, H&E, x100 D) Az diferansiye SHK, H&E, x200

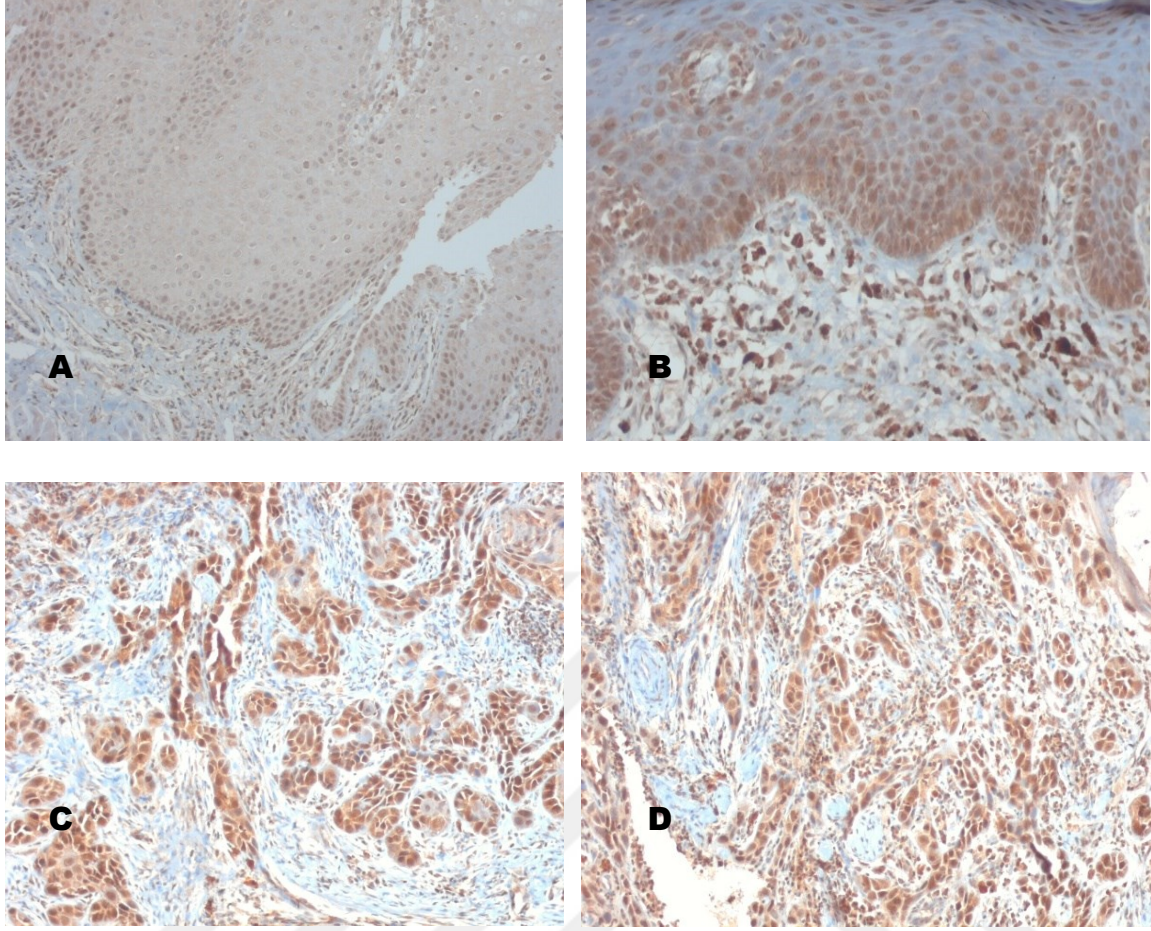
İnflamasyon skor ortalaması, SHK grubunda 2.1; displazi grubunda 1.9; ve EH grubunda 1.3 olarak belirlendi. SHK grubunda inflamasyon skoru istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.022$).

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Snail ekspresyonu: Epitel ve bağ doku hücrelerinde Snail ekspresyonu görüldü. Genel olarak epitelin özellikle bazal tabakasında nükleer boyanma paterni izlendi. Bazı vakalarda (displazi ve EH grubunda) bazal, parabazal ve granüler tabakada pozitif ekspresyon gözlemlendi (Resim 4.3). EH ve displazide bağ dokuda fibroblastlarda ve inflamatuvar hücrelerde de nükleer boyanma izlendi.

SHK olgularında, snail immünreaksiyonu hem parankimal hücrelerde hem de stromal hücrelerde görüldü. Parankimde, tümör adalarının periferindeki bazoloid tümör hücrelerinde daha yoğun olmak üzere nükleer pozitiflik izlendi. Globe kornea alanlarında genellikle boyanma izlenmezken; daha az diferansiye ve küçük hücre grupları şeklinde infiltrasyon alanlarında yoğun nükleer pozitiflik görüldü (Resim 4.3 C, D). Tümör stromasında ise fibroblastlarda, endotel hücrelerde ve inflamatuvar hücrelerde nükleer boyanma şeklinde boyanma paterni görüldü.

EH grubunda olgularının %47,4'ünde Snail ekspresyonu izlenmedi. %26,3'ünün 1 ve %26,3'ünde ise skor 2 düzeyinde pozitiflik saptandı. Displazi grubundaki olguların %26,1'inde snail ekspresyonu 0; olguların %69,6'sında 2 ve %4,3'ünde ise skor 3 düzeyinde boyanma izlendi. SHK grubundaki olguların %64,3'ünde skor 0 iken %14,3'ünde 1, %14,3'ünde 2 ve %7,1'inde ise 3'tür. Snail immünreaktivite H skor ortalama değerleri EH olgularında 0,8; displazi grubunda 0,8 ve SHK grubunda 0.6 olarak belirlendi. Snail immünohistokimyasal ekspresyonu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (Şekil 4.6, Çizelge 4.4).



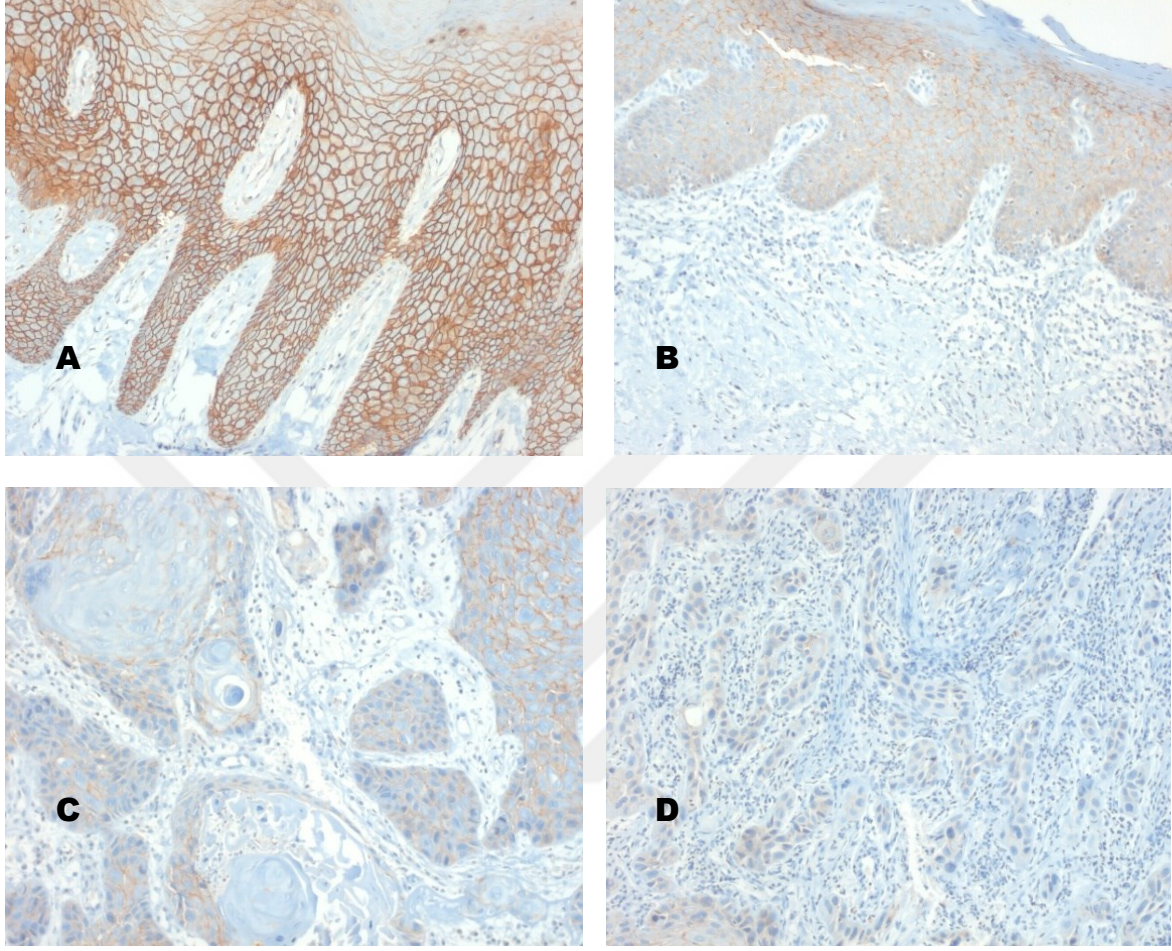
Resim 4.3. Snail immünreaktivitesi A) Bazal ve parabazal hücrelerde Snail (skor 1) keratinositler, DAB, x200. B) Bazal ve parabazal hücrelerde Snail (skor 2) keratinositler, DAB, x200. C,D) Tümör hücrelerinde Snail (skor 3) immünreaktivitesi, DAB, x200

E-kadherin ekspresyonu: Skuamöz epitelin genelinde granüler tabakaya kadar uzanan membranöz patrende boyanma izlendi (Resim 4.4, A). Displastik epitelde, rete uçlarında ve epitelin tomurcuklanma yaptığı alanlarda E-kadherin kaybı görüldü (Resim 4.4, B).

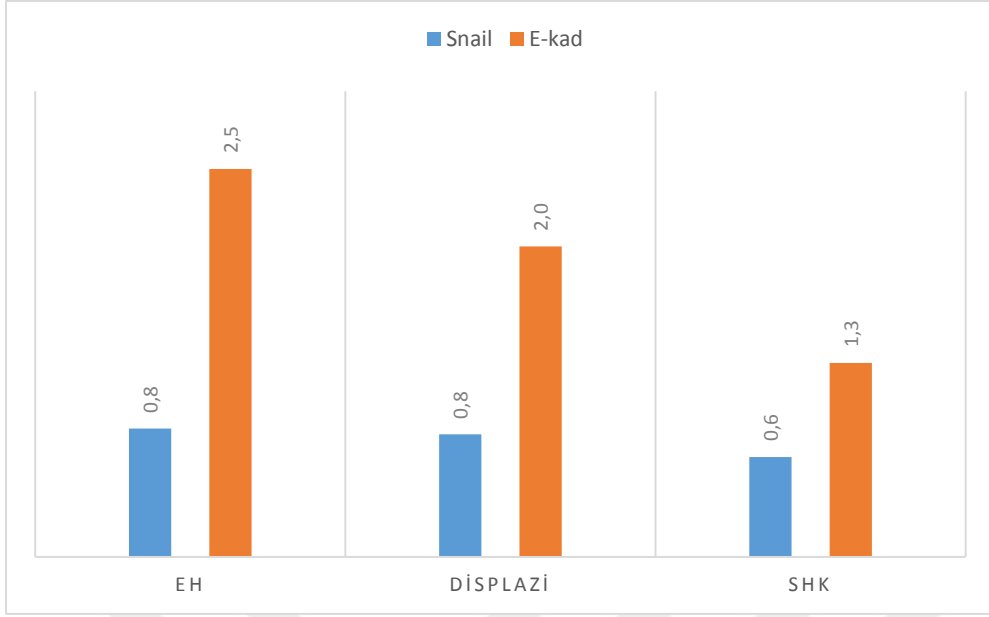
SHK olgularında tümör hücrelerinde genellikle adaların periferinde E-kadherin kaybı izlendi. Genel olarak iyi diferansiye adalarda pozitif ekspresyon görülürken; daha az diferansiye olan ve tümör hücrelerinin kordlar yaptığı alanlarda E-kadherin kaybı izlendi. Ayrıca sub-mukoza ve kasa invazyon alanlarında E-kadherin kaybı görüldü (Resim 4.4, B).

EH grubunda olgularının % 44,4'ünde; displazi grubunda olguların grubundaki olguların % 73,9'unda; SHK grubundaki olguların ise % 93,8'inde E-kadherin kaybı izlendi. E-kadherin immünreaktivite ortalama değerleri EH olgularında 2,5; displazi grubunda 2,0 ve SHK

grubunda 1,3 olarak belirlendi. E-kadherin ekspresyonu SHKlarda, EH grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0.000$) (Çizelge 4.4, Şekil 4.6).



Resim 4.4. E-kadherin immünreaktivitesi A) Oral mukoza epitelinde E-kadherin (skor 3) immünreaktivitesi, DAB, x200. B) Displastik oral mukoza epitelinde rete uçlarında E-kadherin kaybı, DAB x200. C) İyi diferansiye SHK, tümör adalarında E-kadherin (skor 2) immünreaktivitesi, DAB, x200. D) Küçük hücre grupları şeklinde infiltrasyon alanlarında E-kadherin (skor 1) immünreaktivitesi, DAB, x200

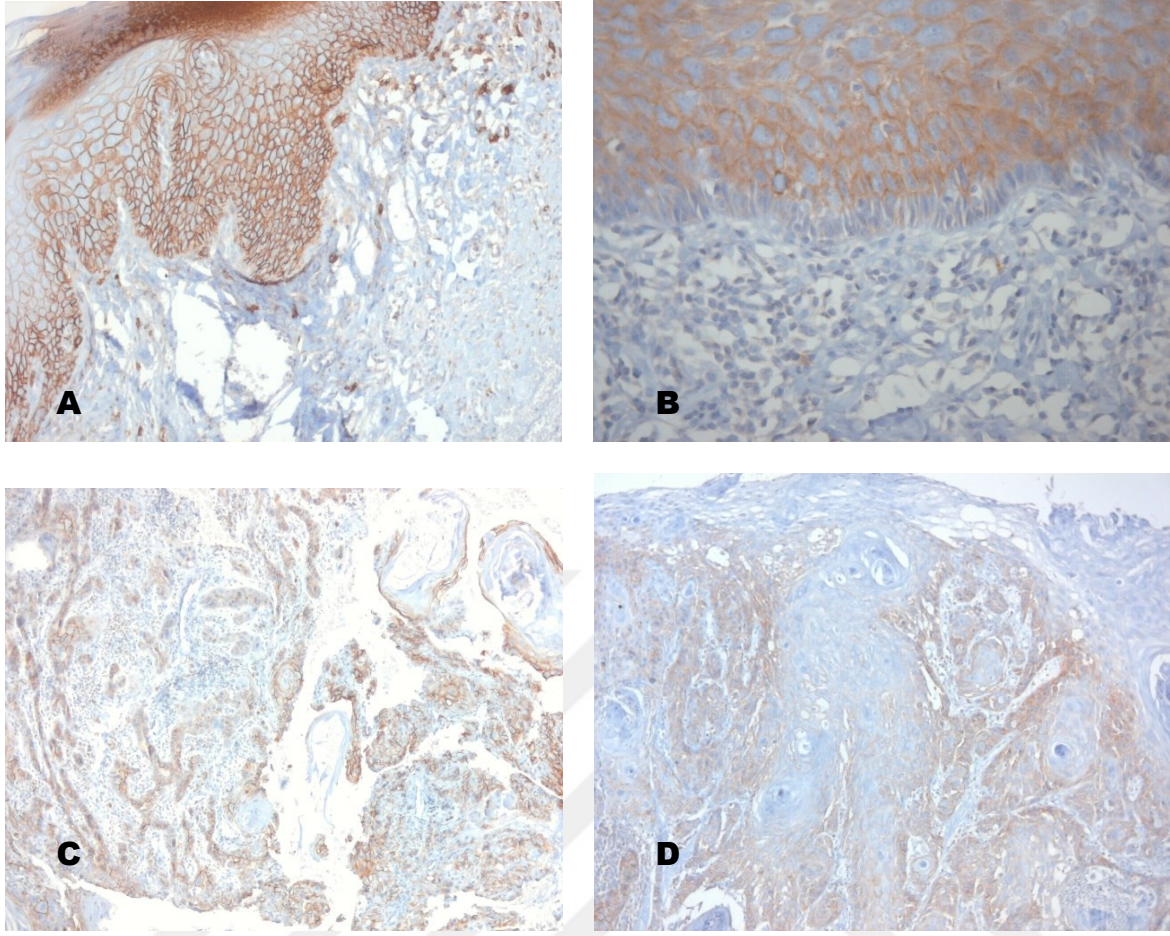


Şekil 4.6. Tüm gruplarda Snail/E-kadherin immünreaktivitesi ortalama değerleri

CD44 ekspresyonu: Genel olarak skuamöz epitelin bazal tabaka keratinositlerinde (birinci ve ikinci sırada) daha yoğun olmak üzere granüler tabakaya kadar uzanan membranöz boyanma paterni izlendi (Resim 4.5, A). Özellikle displastik epitelde bazal 1.ve 2. sırada CD44 ekspresyonu kaybolurken; parabazal üçüncü ve dördüncü sıralarda pozitif hücreler izlendi. Rete uçlarında epitelin tomurcuklanma yaptığı alanlarda CD44 kaybı görüldü. Yine displastik epitelin bazal laminaya bakan kısımlarında kayıplar izlendi (Resim 4.5, B). Bağ dokuda ve inflamatuvar hücrelerde ekspresyon izlenmedi.

SHK olgularında tümör adalarının periferindeki hücrelerde ikinci ve üçüncü sıralarda pozitif hücreler izlendi. Globe kornea alanlarında ve stromada ekspresyon izlenmedi (Resim4.5, C, D).

EH grubunda olgularının %15'inde CD44 protein ekspresyonu izlenmedi. %21,1'nde 1 ve %57,9'unda ise skor 2 düzeyinde pozitiflik saptandı. Displazi grubundaki olguların % 17,4'ünde CD44 ekspresyonu 0; olguların %39,1'inde 1 ve %34,8'inde ise skor 2; % 8,7'sinde ise skor 3 düzeyinde boyanma izlendi. SHK grubundaki olguların % 6,3'ünde skor 0 iken; %25'inde 1, %50'sinde 2 ve %18'inde ise 3'tür. CD44 immünreaktivitesi ortalama skor değerleri şu şekilde saptandı: SHK olgularında 1,8; displazi 1,3 ve EH 1,5 Gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi (Çizelge 4.4, Şekil 4.7).



Resim 4.5. CD44 immünreaktivitesi A) Oral mukoza epitelinde CD44 (skor 3) immünreaktivitesi, DAB, x100. B) Displastik oral mukoza epitelinde CD44 (skor 2) immünreaktivitesi, DAB, x400. C) İyi diferansiye SHK, tümör adalarının periferinde CD44 (skor 2) immünreaktivitesi, DAB, x200. D) İyi diferansiye SHK, tümör adalarının periferinde CD44 (skor 1) immünreaktivitesi, DAB, x100.

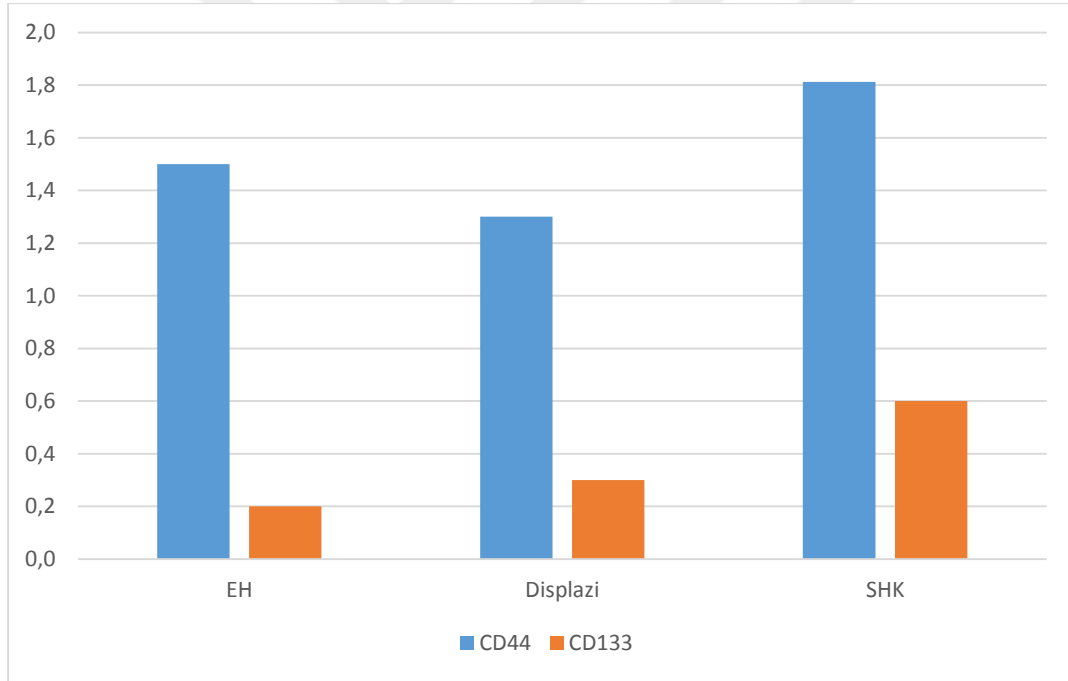
CD133 ekspresyonu: Genellikle skuamöz epitelin bazal tabaka keratinositlerinde daha yoğun olmak üzere, parabazal hücrelerde ikinci ve üçüncü sıralara kadar uzanan membranöz ve sitoplazmik boyanma paterni izlendi (Resim 4.6, A, B).

Displastik epitelde rete uçlarında ikinci ve üçüncü sıralarda pozitiflik izlendi (Resim 4.6, C). Bazı olgularda bazal tabakanın yanısıra, spinoz tabakada da pozitif keratinositler görüldü. Granüler tabakada ise tek tük pozitif hücreler izlendi. Bağ dokuda inflamatuvar hücrelerde pozitif ekspresyon görüldü.

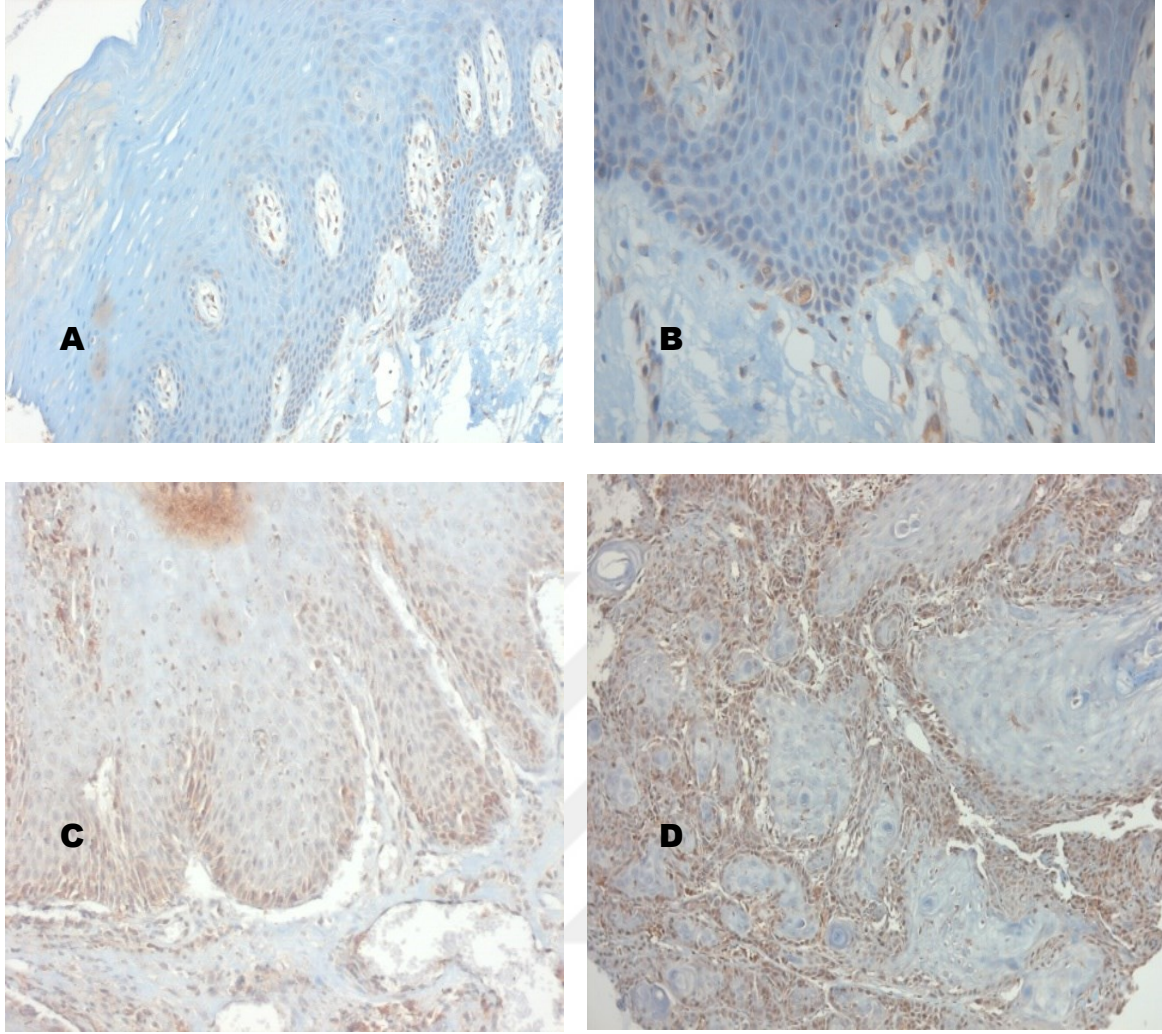
SHK olgularında genellikle tümör adalarının periferinde bazoloid tümör hücrelerinde membranöz ve sitoplazmik pozitif hücreler görülürken; globe kornea alanlarında ekspresyon

izlenmedi (Resim 4.6, D). Tümör stromasında inflamatuvar hücrelerde pozitif ekspresyon izlendi.

EH grubunda olgularının %83,3'ünde CD133 ekspresyonu izlenmedi. %16,7'sinde skor 1 düzeyinde pozitiflik saptandı. Hiçbir olguda skor 2 düzeyinde pozitiflik izlenmedi. Bir olguda CD133 immünreaktivitesi değerlendirilemedi. Displazi grubundaki olguların %73,9'unda CD133 ekspresyonu 0; olguların %26,1'inde skor 1 düzeyinde boyanma izlendi. Hiçbir olguda skor 2 düzeyinde pozitiflik izlenmedi. SHK grubundaki olguların %46,7'sinde skor 0 iken %46,7'sinde 1, %6,7'sinde 2 dir. CD133 immünreaktivitesinin skor ortalamaları, SHK olgularında 0,6; displazi grubunda 0,3; ve EH grubunda 0,2 olarak saptandı. Gruplar karşılaştırıldığında SHK grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.7) ($p=0.05$).



Şekil 4.7. Tüm gruplarda CD44 ve CD133 immünreaktivitesi ortalama skor değerleri

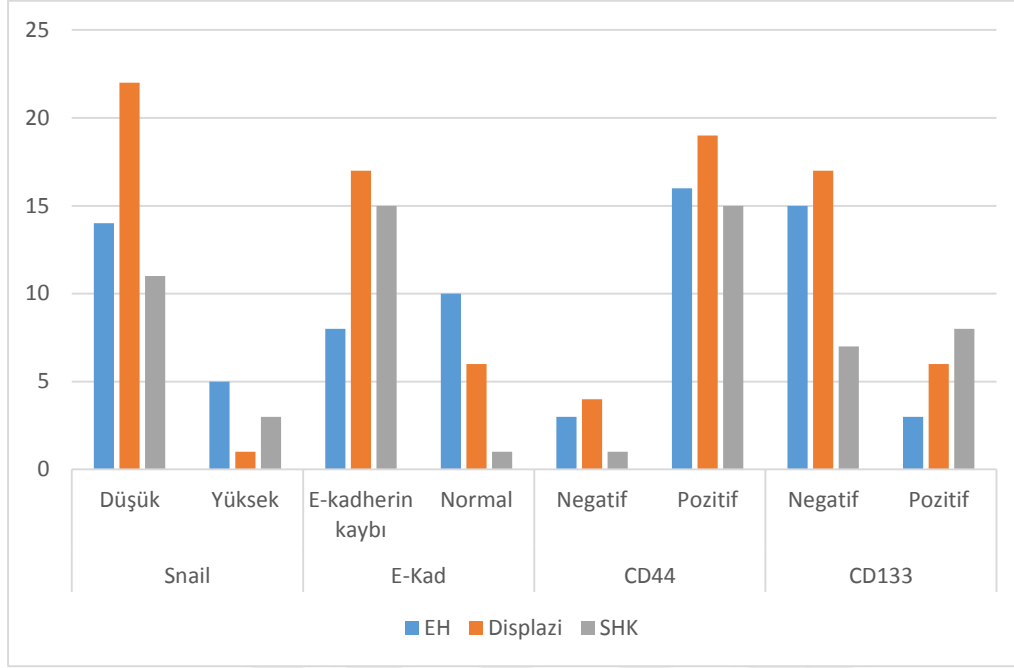


Resim 4.6. CD133 immünreaktivitesi A,B) Oral mukoza epitelinin bazal-parabazal tabaka keratinositlerinde CD133 (skor 1) immünreaktivitesi, DAB, x200; DAB, x400. C) Displastik oral mukoza epitelinde rete ucunda CD133 (skor 1) keratiosit, DAB, x200. D) İyi diferansiye SHK, tümör adalarının periferinde CD133 (skor 2) immünreaktivitesi DAB, x100.

Çizelge 4.4. Tüm olgularda Snail, E-kadherin, CD44 ve CD133 immünreaktivitesi

		EH		Displazi		SHK		P
		N	%	N	%	N	%	
Snail	Düşük Ekspresyon	14	73,7	22	95,7	11	78,6	0,095
	Yüksek Ekspresyon	5	26,3	1	4,3	3	21,4	
E-kad	E-kadherin kaybı	8	44,4	17	73,9	15	93,8	0,006*
	Normal	10	55,6	6	26,1	1	6,3	
CD44	Negatif	3	15,8	4	17,4	1	6,3	0,541
	Pozitif	16	84,2	19	82,6	15	93,8	
CD133	Negatif	15	83,3	17	73,9	7	46,7	0,063
	Pozitif	3	16,7	6	26,1	8	53,3	

*p<0,05



Şekil 4.8. İmmünohistokimyasal parametrelerin olgulara göre dağılımı

4.4. İmmünohistokimyasal Histopatolojik Korelasyon

Çizelge 4.8’de korelasyon analizi verileri bulunmaktadır.

EH grubunda Snail ve CD133 arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde pozitif yönde doğrusal ilişki bulundu. ($p < 0,05$, $r: 0,469$).

SHK grubunda inflamasyon ile CD133 arasında istatistiksel olarak anlamlı güçlü düzeyde negatif yönde doğrusal ilişki saptandı ($p < 0,05$, $r: 0,661$).

Displazi grubunda hiçbir parametre arasında korelasyon izlenmedi.

Snail, CD44, CD133 ve E-kadherin ekspresyonları ve tümör diferansiyasyonu; histolojik derece gibi histopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. Displazi grubunda yüksek dereceli ya da düşük dereceli olgularda; ve yine SHK grubunda “iyi diferansiye” ve “az diferansiye” olgular arasında Snail, CD44, CD133, E-kadherin immünreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p > 0,05$).

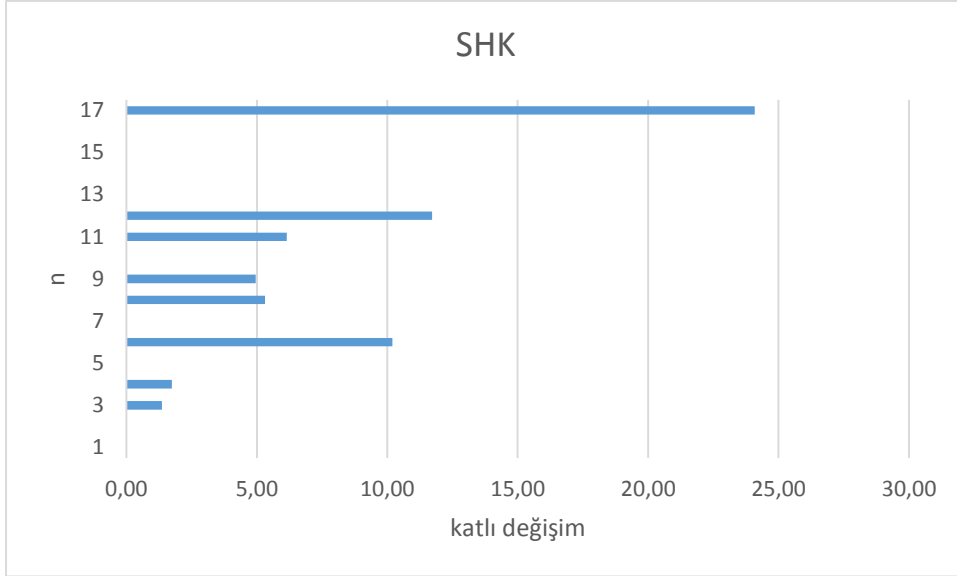
Çizelge 4.5. Snail, CD44, CD133, ve E-kadherin immünreaktiviteileri arasındaki korelasyonun İncelenmesi

			Inflamasyon	Snail	E-kad	CD44	CD133
EH	Inf	r	1,000	0,158	-0,063	0,103	0,354
		p		0,518	0,802	0,674	0,150
	Snail	r		1,000	0,001	0,191	0,469
		p			0,996	0,433	0,049*
	E-kadherin	r			1,000	0,130	0,392
		p				0,607	0,107
	CD44	r				1,000	0,064
CD133	p					0,802	
							1,000
Displazi	Inflamasyon	r	1,000	0,121	0,095	-0,211	0,274
		p		0,583	0,665	0,334	0,205
	Snail	r		1,000	0,344	0,068	0,278
		p			0,108	0,758	0,198
	E-kadherin	r			1,000	0,197	-0,137
		p				0,368	0,533
	CD44	r				1,000	-0,039
CD133	p					0,858	
							1,000
SHK	Inflamasyon	r	1,000	-0,055	0,071	-0,284	-0,661**
		p		0,852	0,793	0,286	0,007
	Snail	r		1,000	-0,360	-0,146	0,142
		p			0,205	0,618	0,645
	E-kadherin	r			1,000	0,445	0,008
		p				0,084	0,976
	CD44	r				1,000	0,237
CD133	p					0,395	
							1,000

4.5. RT-PCR Bulguları

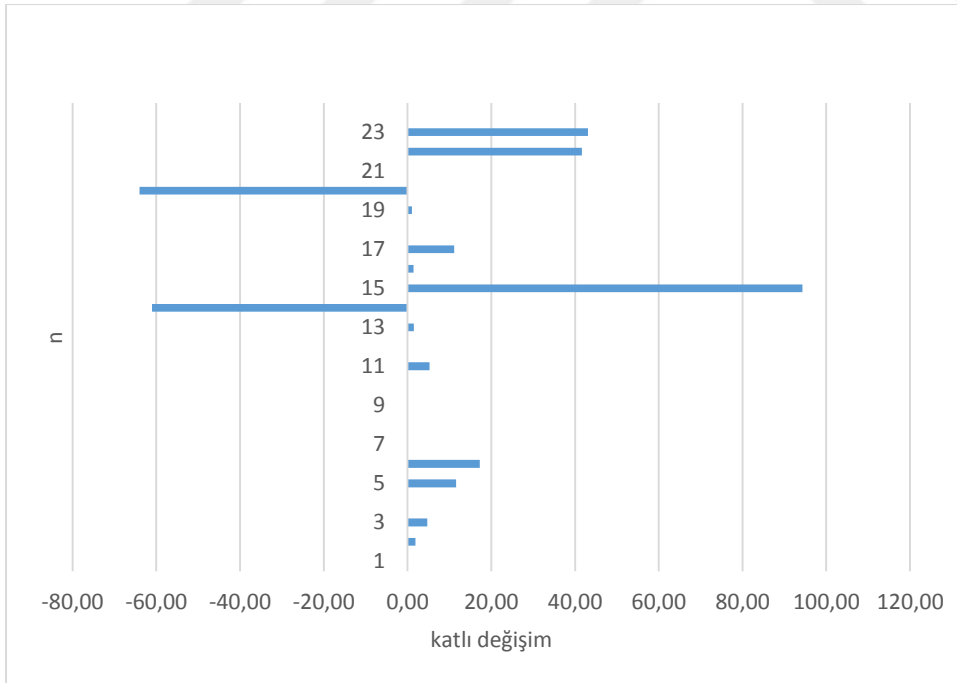
Rölatif Snail mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, SHK olgularının %50'sinde; displazi olgularının %60,9'unda; EH olgularının %89'unda Snail mRNA ekspresyonu belirlendi. EH grubunda Snail mRNA belirlenen olguların oranı SHK grubuna göre (%50) anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0,033).

SHK olgularının sekizinde Snail mRNA ekspresyonunda artış izlenirken; 8 olguda ekspresyon izlenmedi. SHK grubunda hiçbir olguda Snail mRNA düzeylerinde azalma izlenmedi. Snail ekspresyonu saptanan 8 olgunun tümünde (%100) artış yönünde değişiklik görüldü. (Çizelge 4.6, Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SHK grubunda rölatif snail mRNA düzeyleri

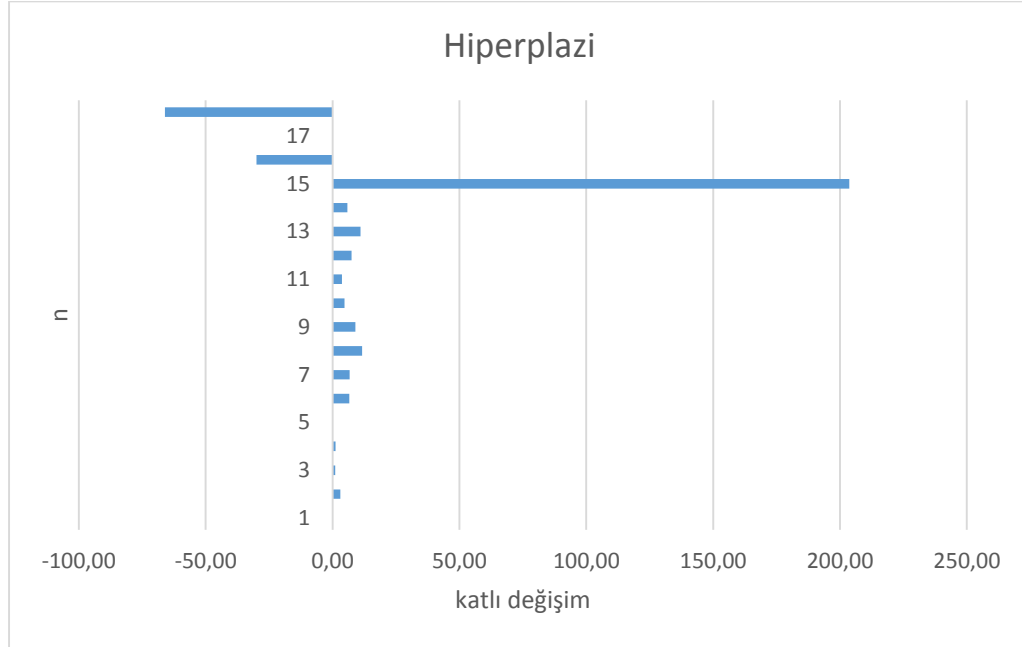
Displazi grubunda 2 olguda kontrole göre azalma; 12 olguda kontrole göre artış izlenirken; 9 olguda ekspresyon izlenmedi (Çizelge 4.6, Şekil 4.10). Displazi grubunda snail ekspresyonu saptanan olguların % 85'inde da artış yönünde ekspresyon belirlendi.



Şekil 4.10. Displazi grubunda rölatif snail mRNA düzeyleri

EH grubunda 11 olguda artış, 2 olguda azalma izlenirken; 2 olguda ekspresyon izlenmedi. (Çizelge 4.6, Şekil 4.11). EH grubunda Snail ekspresyonu gösteren olgular değerlendirildiğinde olgularının % 82,5'inde artış yönünde ekspresyon saptandı.

Snail ekspresyon düzeyleri yönünden gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$).



Şekil 4.11. EH grubunda rölatif snail mRNA düzeyleri

Çizelge 4.6. Rölatif Snail mRNA ekspresyon düzeyleri

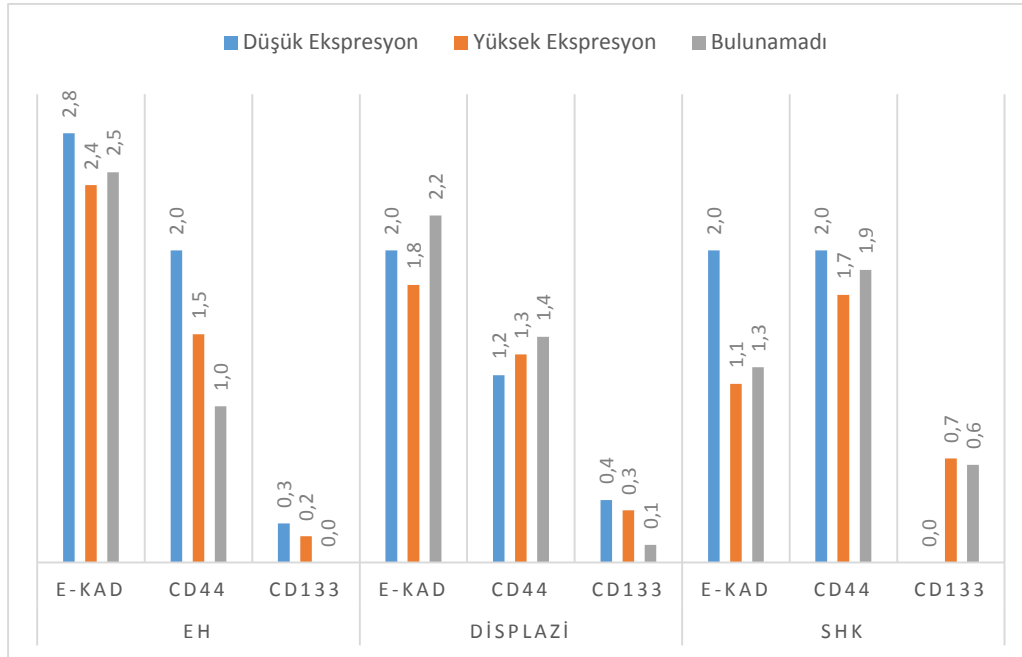
		EH		Displazi		SHK		Toplam		p
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Snail RT-PCR	Artış	3	15,8	2	8,7	8	0,0	5	8,6	0,084
	Azalma	14	73,7	12	52,2	0	50,0	34	58,6	
	Ekspresyon negatif	2	10,5	9	39,1	8	50,0	19	32,8	
Toplam		19	100,0	23	100,0	16	100,0	58	100,0	

CD133 mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, SHK grubunda bir olguda; displazi grubunda 2 olguda artış izlendi. Tüm gruplar açısından diğer olgularda CD133 mRNA ekspresyonu belirlenemedi. Yalnızca üç olguda ekspresyon saptandığından istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

Tüm gruplar birarada değerlendirildiğinde, rölatif Snail mRNA düzeylerinin immünohistokimyasal parametreler (Snail, E-kadherin, CD44, CD133) ile ilişkisi Çizelge 4.7’de verildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ($p>0.05$) (Şekil 4.12).

Çizelge 4.7. Tüm gruplarda Snail mRNA düzeyleri ve immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişki

		Snail RT-PCR						p
		Düşüş		Yükseliş		Bulunamadı		
		N	%	N	%	N	%	
Snail	Negatif	3	60,0	20	58,8	9	52,9	0,915
	Pozitif	2	40,0	14	41,2	8	47,1	
E-kad	E-kaderin kaybı	6	60,0	21	75,0	13	68,4	0,659
	Normal	4	40,0	7	25,0	6	31,6	
CD44	Negatif	1	10,0	3	10,3	4	21,1	0,534
	Pozitif	9	90,0	26	89,7	15	78,9	
CD133	Negatif	7	70,0	18	66,7	14	73,7	0,878
	Pozitif	3	30,0	9	33,3	5	26,3	



Şekil 4.12. Snail mRNA düzeyleri ve immünohistokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin gruplara göre dağılımı ($p>0.05$)

Snail mRNA düzeyleri ile histolojik derece ve tümör diferansiyasyonu gibi histopatolojik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. Displazi grubunda yüksek dereceli ya da düşük dereceli olgularda; ve yine SHK grubunda “iyi diferansiye” ve “az diferansiye” olgular arasında Snail mRNA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$) (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9).

Çizelge 4.8. Displazi grubunda düşük/yüksek dereceli olgularda Snail mRNA düzeyleri

		DD		YD		Toplam		p
		N	%	N	%	N	%	
Snail RT-PCR	Düşüş	1	11,1	1	7,1	2	8,7	0,085
	Yükseliş	7	77,8	5	35,7	12	52,2	
	Bulunamadı	1	11,1	8	57,1	9	39,1	
Toplam		14	100,0	9	100,0	23	100,0	

Çizelge 4.9. SHK grubunda diferansiyasyon derecesi ve Snail mRNA düzeyleri

		Diferansiyasyon				Toplam		p
		İyi		Diğer		N	%	
		N	%	N	%	N	%	
Snail RT-PCR	Yükseliş	5	50,0	3	50,0	8	50,0	1,000
	Bulunamadı	5	50,0	3	50,0	8	50,0	
Toplam		10	100,0	6	100,0	16	100,0	



5. TARTIŞMA

Oral kanser yüksek mortalite ve morbidite oranına sahip kanserlerin başında yer almakta olup hastaların %50'den fazlası ileri evrede tanı almaktadır. Hastalığın evresi, hastaların sağ kalım süreleri ile yakından ilişkilidir. Lenf nodu tutulumu olmayan bir hastanın tedaviyi takiben 5 yıllık sağ kalım oranı %66 - %85 arasında iken, lenf nodu metastazı olanlarda bu oran %9'lara kadar düşmektedir (Thomas, 2012). Bu sebeple diğer kanser türlerinde olduğu gibi, oral kanserde de erken tanı ve tedavi, bireylerin yaşam süresi ve kalitesine önemli ölçüde etki etmektedir.

Oral kanserde tümörün lokal invazyonu, lenf nodu metastazı, uzak metastaz olup olmaması gibi konvansiyonel faktörlerin dışında son yıllarda hücrel ve moleküler düzeyde farklı prognostik faktörler de araştırılmaktadır. Özellikle bu faktörlerin "prekanseroz" dönemdeki lezyonlarda, kansere invazyon sürecinden önce belirlenebilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu süreçteki moleküler mekanizmaların aydınlatılması; bu potansiyel belirteçlerin laboratuvar rutinine girmesine katkı sağlayabilecektir. Bu görüşten yola çıkarak, çalışma materyalimizi "hiperplazi", "displazi" ve "skuamöz hücreli kanser" tanısı alan dokular oluşturmuştur.

Son yıllarda birçok bilimsel çalışma, başta kolorektal, over, karaciğer karsinomu olmak üzere pek çok farklı solid tümörlerde "karsinogenezde kök hücre konseptini" araştırmaktadır. Kök hücreler uzun yaşam süreleri ve kendilerini devamlı yenileyebilme yetenekleri, nedeniyle mutasyonlara son derece açık hedef olmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı oral kanser ve birçok solid tümörde tümörögenezi yönlendiren hücrelerin "kanseroz kök hücreleri" olduğu düşünülmektedir.

Diğer taraftan EMT faktörlerinin diferansiye hücrelere "kanseroz kök hücre" özellikleri kazandırdığı bilinmektedir. Oral kanserde, artmış Snail ekspresyonunun hücrelere invaziv ve metastatik özelliklerin yanısıra düşük proliferasyon, kendini yenileyebilme ve koloni oluşturma gibi kanseroz kök hücre özellikleri kazandırdıkları gösterilmiştir. Snail, Twist1 ve Twist 2 gibi EMT transkripsiyon faktörleri p16 ve p21'i inhibe ederek hücrelerin senesens de kalmalarını engellemektedir (Ansieau, 2008). Bu mekanizmalar, EMT'nin senesens ve apoptozisi baskılayarak karsinogenezde rol aldığını ve tümör progresyonu dışında daha erken lezyonlarda EMT'nin etkili olabileceğini desteklemektedir.

Örneğin, EMT'yi tetikleyen Snail ve Twist1 gibi transkripsiyon faktörlerinin, uzak metastaz görülmeden çok önce "in situ" duktal karsinomlarda, belirlendiği bildirilmiştir (Geradts ve diğeri, 2013). Meme kanserlerinin yanısıra, nazofaringeal kanserler, gastrik ve kolorektal kanserler gibi çeşitli kanserlerde EMT sürecinin aktive edilmesi, farklılaşmış hücrelere kök hücre özellikleri kazandırmaktadır (Ansieau, 2013; Thiery ve Sleeman, 2006). Bu nedenle çalışmamızda EMT faktörleri (Snail, E-kadherin) ve kanser kök hücre belirteçlerinin (CD133, CD44) displazi ve SHK tanısı almış parafine gömülü doku örneklerinde iki farklı yöntem kullanılarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Snail ve CD133 protein ekspresyonları hem immünohistokimyasal olarak, hem de RT-PCR ile belirlenmiş; E-kadherin ve CD44 ise sadece immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Günümüzde immünohistokimyasal değerlendirme, tanısal ve araştırma amaçlı, patolojide laboratuvar rutininde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle dokulardaki protein ekspresyon paternlerinin belirlenmesi, dağılımları ve yoğunluklarının değerlendirilebilmesi mümkün olmaktadır. Biz de çalışmamızda morfolojiyle birlikte protein ekspresyonunun birlikte değerlendirilmesi amacıyla bu yöntemi tercih ettik. Ayrıca, sensitivite ve spesifitesinin moleküler yöntemlere kıyasla daha az olması ve semi-kantitatif değerlendirmeye olanak sağlamasına rağmen tekrarlanabilir ve ucuz bir metod olması araştırmamızda avantaj yaratmıştır (Ramos-Vara ve Miller, 2014).

Çalışmamızda, Snail ve CD133 ekspresyonlarının kantitatif olarak da değerlendirilebilmesi amacıyla RT-qPCR ile her iki belirtecin mRNA düzeyinde belirlenmesi hedeflenmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR, "mikro array", gibi modern metodolojilerin yanısıra "Northern blot" "RNase protection assay" gibi daha eski moleküler yöntemler kullanılarak da belirlenebilmektedir (Schlamp, Weinmann, Krupp, Maass, Galle, ve Teufel, 2008). Mikroarray yöntemi, sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Aynı anda yüzlerce gendeki ekspresyonun değerlendirilebilmesi en büyük avantajıdır. Ancak Northern blot ve RT-PCR ile karşılaştırıldığında, ekspresyondaki küçük değişikliklerin analizinde yetersiz kalmaktadır (Taniguchi, Miura, Iwao, ve Yamanaka, 2001). RT-qPCR yönteminin Northern Blot'a göre daha düşük sensitiviteye, ancak daha yüksek spesifiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Streit, Michalski, Erkan, Kleef ve Friess 2009). RT-qPCR yöntemi ile daha az miktarlarda RNA kullanılarak daha yüksek spesifitede mRNA düzeylerinin kantitatif olarak belirlenebilmesi nedeniyle, çalışmamızda bu yöntem seçilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen olgular, yaş ve cinsiyet gibi demografik veriler açısından değerlendirildiğinde; ortalama yaş EH grubundan (48,3) displazi (55,2) ve SHK grubuna (59,5) göre kademeli artış gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. Benzer şekilde, gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından da önemli farklılık saptanmamıştır. Oral kanserler sıklıkla 50 yaş üstünde görülmekle birlikte, son verilere göre orofaringeal ve oral kanser görülme yaşı ortalama 62.0 olarak bildirilmektedir (Howlader ve diğerleri, 2014; Bethesda, 2015). Gruplar arasında yaş ve cinsiyet dağılımının benzer olması, incelenen belirteçlerin ekspresyon düzeylerinde bu iki demografik parametreye bağlı olarak ortaya çıkabilecek farklılıkların ortadan kaldırılmasını sağlamıştır.

Lezyonların anatomik yerleşimlerine bakıldığında, EH olgularından hiçbirinin ağız tabanında lokalize olmadığı, diğer yandan displastik lezyonların % 9'unun; SHK olgularının ise % 12'sinin ağız tabanında lokalize olduğu belirlenmiştir. 2008-2012 yılları arasında dil kanserlerinde % 2.1; ağız tabanı- dişeti ve oral kavitenin diğer bölgelerinde ise % 23.6 oranında artış rapor edilmiştir (Howlader ve diğerleri, 2014; Bethesda, 2015). SHK etyolojisinde yer alan karsinojenik risk faktörlerinin etkisini en çok gösterdiği yerleşim yerinin ağız tabanı olabileceği belirtilmiştir (IARC çalışma grubu, 2012). Bulgularımız literatüre paralel şekilde ağız tabanındaki lezyonların displazi ve SHK açısından daha riskli olabileceğini desteklemektedir. EH olgularının yerleşimi ise büyük oranda (% 47) bukkal mukozadır. Bu veriler, bukkal mukozanın uygun olmayan protetik restorasyonlar ve yanak ısırma gibi lokal travmatik etkenlere en çok maruz kalan yerleşim yeri olduğunu desteklemektedir (Bethesda, 2015).

Çalışmamızda, histopatolojik parametreler içerisinde yer alan inflamasyon skor ortalaması, SHK grubunda diğer gruplara oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Son yıllardaki bilimsel çalışmalar kronik inflamasyonun karsinogenezle ilişkisini ortaya koymuştur (Romano ve diğerleri, 2016). Kronik inflamasyonun neden olduğu DNA ve doku hasarı ve bu süreçte ortaya çıkan genetik ve epigenetik değişiklikler, karsinogenezde tetiklemektedir (IARC çalışma grubu, 2012). Kronik inflamasyon sürecinde dokularda inflamatuvar hücrelerin yanı sıra keratinositler tarafından da eksprese olduğu gösterilen IL-1, IL-8 gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve TGF-beta gibi büyüme faktörlerinin karsinogenezde etkili olabileceği gösterilmiştir (Loercher ve diğerleri, 2004; Wu ve diğerleri, 2016)

Çalışmamızda SHK, displazi ve EH lezyonlarında Snail için ekspresyon değişiklikleri immünohistokimyasal ve RT-qPCR yöntemleri ile gösterilmiştir. Mendelson ve diğerleri (2012), yüksek Snail immünreaktivitesi gösteren oral skuamöz hücreli tümörlerin, düşük ekspresyon paterni gösterenlere oranla daha kötü prognoza sahip olduğunu bildirmiştir. Yine bir diğer çalışmada artmış Snail ekspresyonunun, oral SHKlarda prognostik bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Smith ve diğerleri, 2003).

Araştırmamızda Snail immünreaktivitesinin; genellikle tümör adalarının periferinde ve az diferansiye alanlarda daha yoğun olduğu izlenmiştir. SHK olgularındaki bu ekspresyon paterninin, invazyon ve metastaz için prognostik değeri olabileceği belirtilmiştir. Bilindiği gibi tümörün tomurcuklanmaları, tümörün invaziv alanındaki tek ya da beş hücreye kadar gruplaşmalarını ifade etmektedir ve bu alanların lenf nodu metastazı için kuvvetli bir belirteç olduğu ileri sürülmektedir (Glasgow, Bleier, ve Burgart, 2012; Wang, Huang, H. ve Huang Z., 2011). Displazi olgularında ise pozitiflik daha çok tomurcuklanma ve polarizasyon kaybı gösteren alanlarda izlenmiştir. Yapılan çalışmalar, EMT sürecindeki epiteliyal polarite kaybının, polarite komplekslerinin fonksiyonlarına ve devamında hücre-hücre bütünlüğüne etki ettiğini göstermektedir. Özellikle bu süreçte Snail ve ZEB1'in önemli rol oynadığı ortaya konmuştur (Takkunen ve diğerleri, 2016). Bu bilgiler, displazi ve SHK olgularında Snail ekspresyon paterninin morfolojik yerleşimini açıklamaktadır.

Snail ekspresyonu açısından gruplar karşılaştırıldığında SHK, displazi ve EH grupları arasında istatistiksel bir farklılık izlenmemiştir ($p>0,05$). Fare derisinde oluşturulan tümörlerde mRNA düzeyinde Snail ekspresyonu gösterilmiştir. İnsanda ise meme kanseri, mide kanseri, oral kanser, hepatoselüler karsinomlarda ve malign melanoma hücrelerinde pozitif Snail mRNA ekspresyonu bildirilmiştir (Blanco ve diğerleri, 2002; Jiao, Miyazaki, ve Kitajima, 2002; Poser ve diğerleri, 2001). Çalışmamızda rölatif Snail mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, displazi ve EH grubunda bazı olgularda artış, bazılarında azalma izlenirken, Snail mRNA'sı pozitif olan tüm SHK olgularında artmış ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir. Ancak, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Rosivatz ve diğerleri (2002), diffüz tip gastrik tümörlerde, 28 tümör olgusunun 11'inde rölatif Snail mRNA ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir. Artmış Snail mRNA ekspresyonu izlenen tümör olgularının % 55'inde E-kadherin kaybı olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda E-kadherin ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiş; displastik epitelde rete uçlarında ve epitelin tomurcuklanma yaptığı alanlarda E-kadherin kaybı izlenmiştir. Tümör hücrelerinde genellikle adaların periferinde; ve az diferansiye

alanlarda daha belirgin olmak üzere E-kadherin ekspresyonunda azalma görülmüştür. SHK olgularındaki bu azalma EH grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0.000$).

İmmünohistokimyasal çalışmalar, baş-boyun kanserleri ve oral kanser dahil olmak üzere birçok kanserde, E-kadherin immünreaktivitesinin azaldığını bildirmektedir (Birchmeier ve Behrens, 1994; Nieto, 2002). Oral kanserde tümörün invaziv yüzeyinde E-kadherin ekspresyon kaybının tümör progresyonunda önemli olduğu ve E-kadherin kaybı olan tümörlerin prognozunun kötü olduğu bilinmektedir (Prall, 2007). Çalışmamızda, özellikle tümörün daha küçük hücre grupları şeklinde infiltrasyon yaptığı alanlarda; sub-mukoza ve kasa invazyon çevresinde E-kadherin immünreaktivitesinde belirgin azalma olduğu dikkati çekmiştir. Çalışma bulgularımız, literatüre paralel şekilde, E kadherin kaybının maligniteyi gösteren bir belirteç olduğu görüşünü desteklemektedir. Kanserlerde E-kadherin inaktivasyonu; hücre-hücre kontağı bağlantılarında belirgin fenotipik değişikliklere neden olarak, invaziv büyümeye yol açabilmektedir (Hirohashi, 1998)

Normal epitel dokusunda hücre stabilizasyonu ve yapısal bütünlüğün sağlanması E-kadherin fonksiyonuyla mümkündür. E-kadherin ekspresyonu direkt olarak Snail, Slug, Zeb1, Zeb2, E12/E47 gibi transkripsiyon faktörleri tarafından inhibe edilmektedir. Hücre adhezyon molekülü ve tümör süpresör gen olarak fonksiyon gören E-kadherinin, kanser progresyonunda özellikle papillomdan invaziv kansere giden süreçte, kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Cano ve diğerleri 2002; Comijn ve diğerleri, 2001).

Çalışmamızda tüm gruplar birarada değerlendirildiğinde, Snail mRNA artışı görülen olguların % 75'inde E-kadherin kaybı gösterilmiştir. Ancak Rosivatz ve diğerleri (2002)'nin bulgularına paralel şekilde Snail ekspresyonu ve E-kadherin kaybı arasında korelasyon gösterilememiştir.

İn vitro koşullarda oral skuamöz hücreli kanser hücrelerinde Snail mRNA ekspresyonu arttıkça, E-kadherin ve desmoglein 2 mRNA düzeylerinde azalma gösterilmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Birçok çalışma, oral kanser de dahil olmak üzere, farklı tümörlerde E-kadherin mRNA ekspresyon düzeylerinde ve immünreaktivitesinde belirgin azalma rapor etmesine rağmen, Snail ile negatif korelasyon gösterilememiştir (Comijn ve diğerleri 2001; Miyoshi ve diğerleri 2004; Sakamoto ve diğerleri, 2012).

Takunen ve diğeri (2006), primer oral skuamöz hücreli kanserden izole ettikleri hücrelerde, Snail'in yanısıra ZEB1 ve ZEB2 gibi EMT faktörlerinin E-kadherin ekspresyonunu baskıladığını göstermişler; ve EMT 'nin oral kanserde Snailden bağımsız olarak da tetiklenebileceğini öne sürmüşlerdir. Buna ek olarak SHK'larda invazyon sürecinde EMT ile birlikte, podoplanin aracılı aktin remodelasyonunun da etkili olduğu bildirilmiştir (Wicki ve Christofori, 2006).

Sonuç olarak bu süreçte EMT bağımlı ve EMT bağımsız invazyonun eş zamanlı gerçekleştiği öne sürülmektedir (Wicki ve Christofori, 2006). Çalışma bulgularımız değerlendirildiğinde, Snail ekspresyonu değişikliklerinin displaziden oral kansere geçiş sekansında tek başına etkin faktör olmayabileceği akla gelmektedir. Snail dışında ZEB1, Zeb2, Slug gibi EMT faktörlerinin de invazyon sürecinde rol oynayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Diğer yandan çalışma bulgularımız, oral karsinogenezde EMT bağımsız invazyonun da rol alabileceği görüşünü desteklemektedir. Çalışmamızın bir limitasyonu vaka sayısının sınırlı olmasıdır. Daha fazla sayıda olgunun değerlendirildiği araştırmalarda Snail'in prognostik değeri daha açık olarak ortaya konabilir.

Oral SHKlerde günümüze kadar birçok kanser kök hücre belirleyicisi tanımlanmıştır. Bunlardan bir kısmı hücre yüzey molekülleri, bir kısmı ise transkripsiyon faktörleridir (Gonzales-Moles ve diğeri, 2013). Hücre yüzey moleküllerinden CD133, CD44, ve CD90, CD24 tür. Birçok araştırmacı bu yüzey moleküllerinin kanser başlatıcı hücrelerin belirlenmesinde yararlı olabileceğini savunmaktadır (Kumamoto ve Ohki, 2010; Ishizawa ve diğeri, 2012; Joshua ve diğeri, 2012).

CD133; prominin olarak ta bilinen, bir transmembran glikoproteinidir. Hematopoetik ve nöral dokular başta olmak üzere birçok organda kök hücre özelliği gösteren hücrelerde ekspresyonu saptanmıştır. Özellikle kolorektal kanserlerde kanser kök hücre yüzey belirteci olarak kabul edilmektedir. Kolorektal kanserler dışında, akciğer ve pankreatik kanserlerde yüksek CD133 ekspresyonunun, hastaların sağ kalım oranlarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang, 2004). Ancak, küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde, CD133 ekspresyonunun prognostik değeri açıklığa kavuşmamıştır.

Çalışmamızın öne çıkan bulgularından biri, CD133 immünreaktivitesinin, SHK olgularında, EH grubuna göre anlamlı derecede yüksek olmasıdır ($p=0.05$). EH grubunda olguların % 16'sında, displazi grubunda % 27'sinde; SHK olgularının ise % 53'ünde pozitif CD133 immünreaktivitesi izlenmiştir. Bulgularımıza paralel şekilde, Ravindran ve diğerleri (2012), CD133 immünreaktivitesinin oral epiteliyal displaziden oral kansere kadar olan sekansta göreceli olarak arttığını ve Musahi-1 ile koekspresyon gösterdiğini bildirmiştir. Bir diğer immünohistokimyasal çalışmada, oral kanserde tümör hücrelerinde CD133 immünreaktivitesinin % 60'lara kadar artış gösterdiği rapor edilmiştir. (Oliveira, L. ve diğerleri, 2013)

CD133'ün, oral kanserde tümörü oluşturan hücrelerin yaklaşık % 1-3 tarafından eksprese edildiği ve bu hücrelerin kemoterapiye direnç gösterdiği belirtilmiştir (Zhang ve diğerleri, 2010). Bir diğer çalışmada, CD133 eksprese eden hücrelerin immünsüpresif farelere transplante edildiğinde yüksek tümörojenik etki gösterdikleri bildirilmiştir. Bu veriler ışığında, CD133 ekspresyonunun oral karsinogenezde etkili olabileceği düşünülmektedir.

CD133 mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, SHK grubunda bir olguda; displazi grubunda 2 olguda artış izlenmiştir. Tüm gruplar açısından diğer olgularda CD133 mRNA ekspresyonu belirlenmemiştir. Bu veriler, displazi ve kanserde CD133 protein ekspresyon değişikliklerinin bulunmadığını göstermemektedir. Bilindiği gibi, mRNA düzeylerinin güvenilirliği protein düzeyinde eşleştirilmesi ile orantılıdır (Kendrick, ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda da bu eşleştirme immünohistokimya yöntemi gerçekleştirilmiş ve olguların % 29'unda (EH grubunda 3; displazi grubunda 6; SHK grubunda 8 olguda) pozitif ekspresyon saptanmıştır. İn vitro çalışmalar, oral kanserde tümör hücrelerinin % 1-3'ünün CD133 eksprese ettiğini göstermiştir (Zhang ve diğerleri, 2010). Diğer hücre yüzey belirteçlerine göre daha az eksprese edilmesi, olgu seçimi ve metodolojik farklılıklar in vivo şartlarda CD133 ekspresyonunun gösterilememesine neden olabilir.

Çalışmamızda, SHK grubunda CD133 immünekspresyonu ve inflamasyon skoru arasında negatif yönde korelasyon izlenmiştir. Son dönemde yapılan araştırmalar, kronik inflamasyonun, sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla kanser kök hücre yolaklarını aktive edebildiğini vurgulamaktadır. Wnt- β -katenin, NF- κ B ve STAT 3 gibi kanser kök hücre sinyal yolakları tümör mikroçevresindeki sitokinler tarafından tetiklenebilmektedir (Romano ve diğerleri, 2016). Kolon kanseri hücreleri üzerinde yürütülen bir çalışmada,

CD133⁺/ALDH⁺ tümör hücrelerinin, CD133⁻/ALDH⁻ olanlara göre daha yüksek düzeyde IL-6 ürettikleri gösterilmiştir (Lin ve diğerleri, 2011). IL-6'nın STAT 3 sinyal yolağını stimüle ederek, karsinogenezde rol oynadığı bilinmektedir (Kaptein, A., Paillard, V., ve Saunders, M., 1996) Çalışmamızda gösterilen CD133 ekspresyonu ve inflamasyon arasındaki negatif korelasyon, kolon kanseri hücrelerinde etkin olduğu öne sürülen IL-6 aracılı STAT 3 sinyal yolağının inflamasyon- oral karsinogenez etkileşiminde belirgin rolü olduğunu desteklemektedir. Bulgularımız, tümör mikroçevresinde bulunan diğer pro-inflamatuar sitokinler (IL-1, TNF-alfa, IL-8 vb gibi) tarafından aktive edilebilen Wnt- β -katenin ve NF- κ B kanser kök hücre sinyal yollarının oral karsinogenezde daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Li ve diğerleri (2014) kolon kanserlerinde CD133 ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, tümör dokusuna komşu sağlıklı epiteli kontrol grubu olarak kullanmıştır. Toplam 49 kolon kanseri vakasının 18'inde CD133 pozitif bulunmuş; CD133 ekspresyonu ile yaş, cinsiyet, tümör derinliği, TNM, histolojik tip ve lenfatik metastaz arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır. Benzer şekilde çalışmamızda da CD133 immünreaktivitesi ve klinikopatolojik parametreler arasında korelasyon gösterilememiştir. CD133 ekspresyonunun klinikopatolojik parametrelerle ilişkilendirilememesi, immünreaktivitenin değerlendirilmesindeki yöntem farklılıkları ve olgu sayılarındaki farklılıklar gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir. Diğer yandan, SHK olgularındaki yüksek CD133 immünreaktivitesi, CD133'ün oral karsinogenezde ümit vadeden bir belirteç olabileceği görüşünü desteklemektedir.

CD44, hücre-hücre kontağı, hücre adhezyonu ve migrasyonunda rol alan glikoprotein yapısında bir hücre yüzey molekülüdür. CD44'ün çok çeşitli kanserlerde tirozin kinaz resptörlerini aktive ederek, tümör hücrelerinin proliferasyon kapasitelerinde yaşam sürelerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Omara-Opyene, Qiu, Shah ve Iczkowski, 2004; Misra, Toole, ve Ghatak, 2006; Sheridan ve diğerleri, 2006).

Baş-boyun kanserlerinde izole edilen CD44 pozitif tümör hücrelerinin yüksek tümörojenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Noto ve diğerleri, 2013). Bu hücre popülasyonu tümör hücrelerinin %10'dan azını oluşturmakla birlikte, immünsüpresif farelerde tümör oluşturabilme yeteneğine sahiptir (Chen ve diğerleri, 2013).

Çalışmamızda CD44 ekspresyonu immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. EH grubunda olguların %84'ünde, displazi grubunda %83'ünde; SHK olgularının ise %94'ünde pozitif CD44 immünreaktivitesi izlenmiştir. CD44 immünreaktivitesi ortalama değerleri, hiperplazi ve displazi olgularından SHK'a doğru kademeli olarak artış gösterse, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bulgularımıza paralel şekilde Margaritescu ve diğerleri (2011), sağlıklı oral epitel dokularının %80'inde, pozitif CD44 ekspresyonu olduğunu göstermiştir. CD44 ekspresyonu açısından normal oral mukoza ve SHK arasında anlamlı farklılık olmaması, CD44'ün displazi ve oral kanserde tek başına bir belirteç olarak kullanılabileceğini desteklememektedir.

Çalışmamızda CD44 ekspresyonunun, EH grubunda skuamöz epitelin bazal tabaka keratinositlerinde daha yoğun olmakla birlikte bazı olgularda granüler tabakaya kadar uzandığı izlenmiştir. Displastik epitelde ise rete uçlarında, bazal laminaya bakan kısımlarda CD44 ekspresyon kaybı izlenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda ekspresyon paterniyle ilgili çelişkili bulgular rapor edilmiştir. Bunlardan büyük kısmı CD44 ekspresyonunun bazal tabakada daha yoğun başlayarak epitelin orta ve üst üçlüsüne doğru azalarak devam ettiğini göstermişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, normal oral mukozada, yine bazal ve parabazal keratinositlerde yoğun CD44 ekspresyonu bildirilmiş; yanısıra, bazı olgularda bazal laminaya bakan yüzde ise CD44 ekspresyon kaybı olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda diferansiyasyon derecesi ve CD44 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki olmamakla birlikte, SHK olgularında tümör adalarının periferinde, ikinci ve üçüncü sıralarda CD44 pozitif hücreler görülürken. globe kornea alanlarında ekspresyon izlenmemiştir. Ghuwalewala ve diğerleri (2016), CD44 immünreaktivitesinin SHK larda belirli bir ekspresyon paterni göstermediğini ve diferansiyasyonla ilişkili olmadığını belirtirken, bir diğer çalışmada, iyi diferansiye SHKlarda daha yoğun CD44 boyanma skorları yanısıra globe kornea alanlarında boyanma olmadığı bildirilmiştir (Margaritescu ve diğerleri, 2011).

Literatür verilerinde ekspresyon paternlerine ait çelişkili bulguların nedeni şu şekilde açıklanabilir. Oral mukozada CD44'ün CD44s ve CD44v6 olmak üzere iki alt tipinin eksprese olduğu bilinmekle birlikte, hiperplaziden kansere geçiş sürecinde hangi varyantın ne oranda ekspresyon gösterdiği henüz açıklığa kavuşturulamamıştır. Bu sebeple CD44 pozitif ekspresyonun ya da kaybının prognostik belirteç olarak kabul edilip edilemeyeceği tartışmalıdır. Bu tartışmalar, CD44'ün tek başına kullanılmayacağını ortaya koymaktadır. Çözüm yolu olarak birçok araştırmacı, CD44 ile birlikte bir diğer belirtece ihtiyaç

duyulduğunun altını çizmektedir. Bu belirteçler içersinde immünohistokimyasal çalışmalarda öne çıkan CD24'tür. Normal koşullarda, CD44 ve CD24 epitel hücrelerinin diferansiyasyon sürecinde rol almaktadır. CD24 ekspresyonundaki azalmanın CD44/CD24 dengesinde değişikliğe yol açarak, epitelial bütünlüğün bozulması sonucu tümörogeneze neden olabileceği öne sürülmektedir (Abdulmajeed ve diğerleri, 2013)

İmmünohistokimyasal çalışmalar, CD44^{yüksek} /CD24^{düşük} hücre tipinin kanserlerde sağlıklı dokulara oranla yüksek olduğunu göstermektedir (Kreso ve Dick, 2014). Primer oral kanserden izole edilen hücre serilerinde, CD44 yüksek/CD24 düşük ekspresyon profilinin kanser kök hücre ve EMT fenotipik özellikleri gösterdiği bildirilmiştir (Ghuwalewala ve diğerleri, 2016).

Birçok bilimsel araştırma, çeşitli kanserlerde EMT sürecine giren hücrelerin, kanser kök hücre özellikleri kazanabildiğini göstermektedir (Ansieau, 2013; Geradts ve diğeri, 2013; Zhu ve diğerleri, 2012). Epitel hücrelerinde EMT süreci, Snail, Twist ve ZEB-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ya da TGF-beta gibi büyüme faktörleri yoluyla ile tetiklenmektedir (Thiery ve Sleeman, 2006).

İn vitro çalışmalar, Snail ekspresyonunun doza bağlı etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Düşük ancak belirlenebilir düzeyde Snail mRNA düzeylerinin, gastrik kanser hücrelerinde E-kadherin kaybına neden olmadığı ve hücrelerel kontakların korunduğu bildirilmiştir (Rosivatz, 2006). Snail'in yüksek ekspresyonu ise hücrelerde saçılmaya ve E-kadherin ekspresyonunda % 95 oranında azalmaya yol açmıştır.

Çalışmamızda her iki yöntemle (RT-PCR ve immünohistokimyasal olarak) Snail ekspresyonunun, E-kadherin, CD133, ve CD44 immünreaktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirdiğimizde, Snail /yüksek ve Snail/düşük ekspresyon gösteren olgular arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Benzer şekilde Zhu ve diğerleri (2012), Snail ile muamele edilen oral kanser hücrelerinde (SCC9), CD133 açısından kontrol grubu hücreleriyle anlamlı farklılık olmadığını; ancak CD44 ekspresyonunun pozitif olduğunu göstermiştir.

Memeli epitel hücrelerinin yüksek TGF-beta ve Snail ekspresyonu sonucu 12. günde kanser kök hücre (CD44+/CD24-) özelliği kazandıkları gösterilmiştir (Mani ve diğerleri, 2008). İnsan embriyonik kök hücrelerinde, agregatların periferindeki hücrelerde artmış Snail,

vimentin ve MMP-9 ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin OCT-4 ve Nanog gibi totipotent transkripsiyon faktörlerini de ürettiği gösterilmiştir (Eastham ve diğerleri, 2007).

İn vitro çalışmaların birçoğunda EMT ve kanser kök hücre belirteçleri arasında ilişki gösterilse de (Lim ve diğerleri, 2016; Ma, Wang, Huang, Zhang, ve Sun, 2015; Ota ve diğerleri, 2016) bu ilişkinin varlığı in vivo koşullarda sınırlı sayıda çalışmada değerlendirilmiştir. Çok yeni olarak, oral skuamöz hücreli kanser olguları üzerinde yürütülen bir immünohistokimyasal çalışmada, EMT ve kanser kök hücre belirteçleri arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir. (Attramadal ve diğerleri, 2015) Diğer yandan EMT sürecini tetikleyen ZEB1 ve kanser kök hücre belirteci BMI1 mRNA düzeylerinin oral skuamöz hücreli karsinomlarda artış gösterdiği ve E-kadherin ekspresyonunda azalmaya; vimentin ekspresyonunda ise artışa neden olduğu bildirilmiştir (Kurihara ve diğerleri, 2015).

Sonuç olarak çalışma bulgularımız EMT-kanser kök hücre etkileşimininde yer alan CD133 ve E-kadherin'in oral kanser progresyonunda ümit vadeden tanısal belirteçler olabileceğini düşündürmektedir. Bu alanda yapılacak olan çalışmalar kanser kök hücrelerinin patobiolojisinin daha iyi anlaşılmasına, ve bu hücreleri spesifik olarak hedef alan anti-tümör ilaçların ve tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayabileceği inancındayız.



6. SONUÇ

Oral kanser, displazi ve hiperplazi olgularının demografik bulguları literatür bulgularıyla uyumludur.

İnflamasyon skoru, hiperplazi ve displazi olgularına göre oral kanserde daha yüksektir. Bu veri inflamasyon ve oral karsinogenezis arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Çalışma bulgularımız hiperplaziden oral kansere kadar olan sekansta E-kadherin immünreaksiyonunda azalma; CD133 immünreaksiyonunda ise artış olduğunu göstermektedir ($p \leq 0,05$). Bu iki proteinin, kanser progresyonunda potansiyel diagnostik belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

RT-qPCR ile pozitif Snail mRNA ekspresyonu saptanan olgular içinde SHK grubu açısından olguların %100'ünde artış izlenmiştir. Bu oran, displazi olgularında % 85 ve hiperplazi grubunda ise %82,5 olarak saptanmıştır.

Çalışma sonuçları rölatif Snail mRNA artışı izlenen olguların, Snail mRNA düzeyleri ve immünohistokimyasal parametreler (Snail, CD44, CD133, E-kadherin) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunamadığını göstermiştir ($p > 0,05$). Bu da Snail ekspresyonundaki artışın bağımsız bir parametre olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdulmajeed, A.A., Dalley, A.J. and Farah, C.S. (2013). Putative cancer stem cell marker expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 42(10), 755-60.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988.
- Amagasa, T. (2011). Oral premalignant lesions. *International Journal of Clinical Oncology*, 16(1), 1-4.
- Ansieau, S. (2013). EMT in breast cancer stem cell generation, *Cancer Letters*, 338(1), 63-8.
- Arnoux, V., Nassour, M., L'Helgoualc'h, A., Hipskind, R.A. and Savagner, P. (2008). Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Molecular Biology and Cell*, 19(11), 4738-49.
- Attramadal, C.G., Kumar, S., Boysen, M.E., Dhakal, H.P., Nesland, J.M. and Bryne M. (2015). Tumor Budding, EMT And Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. *Anticancer Research*, 35(11), 6111-20.
- Beard, J. (1902). Embryological aspects and etiology of carcinoma. *Lancet*, 1, 1758-1761.
- Beenken, S.W., Sellers, M.T., Huang, P., Peters, G., Krontiras, H., Dixon, P., Stockard, C., Listinsky, C., Grizzle, W.E. and Bethesda, M.D. (1999). Transforming growth factor alpha (TGF-alpha) expression in dysplastic oral leukoplakia: modulation by 13-cis retinoic acid. *Head and Neck*, 21(6), 566-73.
- Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994). Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1198, 11–26.
- Blanco, M.J., Moreno-Bueno, G., Sarrío, D., Locascio, A., Cano, A., Palacios, J. and Nieto, M.A. (2002). Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 21, 3241–3246.
- Bonnet, D. and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nature Medicine*, 3(7), 730-7.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clinical Chemistry*, 55(4), 611-22.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J. and del Barrio, M.G. (2002). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nature Cell Biology*, 2(2),76-83.

- Carinci, F., Stabellini, G., Calvitti, M., Pelucchi, S., Targa, L. and Farina, A. (2002). CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma”, *Journal of Craniofacial Surgery*, 13(1), 85-9.
- Chaturvedi, A.K., Anderson, W.F. and Lortet-Tieulent, J. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *Journal Clinical Oncology*, 31, 4550- 4559.
- Chen, Y.W., Chen, K.H., Huang, P.I., Chen, Y.C., Chiou, G.Y. and Lo W.L. (2010). Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)ALDH1(+) cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(11), 2879-92.
- Chi, A.C., Day, T.A. and Neville, B.W. (2015). Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer Journal Clinics*, 65(5), 401-21.
- Clay, M.R., Tabor, M., Owen, J.H., Carey, T.E., Bradford, C.R. and Wolf, G.T. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase, *Head and Neck*, 32(9), 1195-201.
- Cohnheim, J. (1875). Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. *Virchows Arch*, 65:64-69.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*, 65(23), 10946-10951.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., van Grunsven, L, Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D. and van Roy, F. (2002) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell*, 7, 1267-1278.
- Cooper, J.S., Pajak, T.F., Forastiere, A.A., Jacobs, J., Campbell, B.H., Saxman, S.B., Kish, J.A., Kim, H.E., Cmelak, A.J., Rotman, M., Machtay, M., Ensley, J.F., Chao, K.S., Schultz, C.J., Lee, N. and Fu, K.K. (2004). Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England Journal of Medicine*, 6;350(19), 1937-44.
- Çiçek, A.F. (2010). Kolon Kanserlerinin Biyolojisinde ve Prognozunda Kanser Kök Hücrelerinin Rolü. *GATA Patoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi*.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Shelton, A. A. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10158-10163.
- Eastham, A.M., Spencer, H., Soncin, F., Ritson, S., Merry, C.L., Stern, P.L. and Ward, C.M. (2007). Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Research*, 1;67(23), 11254-62.

- Ferlay, J., Soerjomataram, I. and Ervik, M. (2015). *Globocan 2012 version 1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base*, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. globocan.iarc.fr. Accessed, 11.
- Fujii, R., Yorihiisa, I., Katsushi, S., Nobuya, S., Koji, S., Seiji, S., Noboru, H., Kuninori, O., Yoichiro, S., Yoshihiro, W., Hiroyuki, O., Toshiki, T., Kaori, K., Masato, F. and Kaoru, O. (2014). Restoration of E-cadherin expression by selective Cox-2 inhibition and the clinical relevance of the epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 33, 40.
- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L. and Fuchs, E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell*, 95(5), 605-14.
- Geradts, J., de Herreros, A.G., Su, Z., Burchette, J., Broadwater, G. and Bachelder, R.E. (2011). Nuclear Snail1 and nuclear ZEB1 protein expression in invasive and intraductal human breast carcinomas, *Human Pathology*, 42(8), 1125-31.
- Gerber, J.M., Smith, B.D., Ngwang, B., Zhang, H., Vala, M.S., Morsberger, L., Galkin, S., Collector, M.I., Perkins, B., Levis, M.J., Griffin, C.A., Sharkis, S.J., Borowitz, M.J., Karp, J.E. and Jones, R.J. (2012). A clinically relevant population of leukemic CD34(+)/CD38(-) cells in acute myeloid leukemia. *Blood*, 12, 119(15), 3571-7.
- Ghuwalewala, S., Ghatak, D., Das, P., Dey, S., Sarkar, S., Alam, N., Panda, C.K. and Roychoudhury, S. (2016) CD44(high)/CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Research*. 16(2):405-17.
- Gonzalez-Moles, M.A., Scully, C., Ruiz-Avila, I. and Plaza-Campillo, J.J. (2013). The cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma, *Oral Oncology*, 49(8), 738-46.
- Greene, F.L., Page, D.L., Fleming, I.D., Fritz, A.G., Balch, C.M., Haller, D.G. and Morrow, M. (2002). *American Joint Committee on cancer. Cancer staging manual*. Springer: New York.
- Grizzle, W.E., Srivastava, S. and Manne, U. (2010). The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia, *Cancer Biomarkers*, 9(1-6), 21-39.
- Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *American Journal of Pathology*, 153, 333–339.
- Honeth, G., Bendahl, P.O., Ringnér, M., Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S.K., Lövgren, K., Grabau, D., Fernö, M., Borg, A. and Hegardt, C. (2008). “The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors”, *Breast Cancer Research*, 10(3), 53.
- Hosen, N., Park, C. Y., Tatsumi, N., Oji, Y., Sugiyama, H., Gramatzki, M., Weissman, I. L. (2007). CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(26), 11008-11013.
- Howlader, N., Noone, A.M. and Krapcho, M. (2012). *SEER Cancer Statistics Review*.

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Biological agents. Volume 100 B. (2012) A review of human carcinogens. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks in Humans*. 100(Pt B), 1-441.
- Ishizawa, K., Rasheed, Z.A., Karisch, R., Wang, Q., Kowalski, J. and Susky, E. (2012). "Tumor-initiating cells are rare in many human tumors", *Cell Stem Cell*, 7(3), 279-82.
- Jiao W, Miyazaki, K. and Kitajima, Y. (2002) Inverse correlation between E-cadherin and Snail expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *British Journal of Cancer*, 86, 98–101.
- Johnson, N. (2005). Squamous cell carcinoma. In: Eveson JW, Reichart, P., Sidransky, D., Barnes, L., editors. Pathology and genetics of head and neck tumors. *World Health Organization classification of tumors*. Geneva, Switzerland: WHO Press; 230-39.
- Joshua, B., Kaplan, M.J., Doweck, I., Pai, R., Weissman, I.L. and Prince, M.E. (2012). Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness, *Head and Neck*, 34(1), 42-9.
- Kaptein, A., Paillard, V. and Saunders, M. (1996) Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *Journal of Biology and Chemistry*. 15;271(11), 5961-4.
- Kapucuoğlu, N., Bozkurt, K.K., Başpınar, Ş., Koçer, M., Eroğlu, H., Akdeniz, E. ve Akçil, R. (2015). The clinicopathological and prognostic significance of CD24, CD44, CD133, ALDH1 expression in invasive ductal carcinoma of the breast: CD44/CD24 expression in breast cancer. *Pathology Research Practice*, 211(10), 740-7.
- Kazi, R., Sayed, S.I. and Dwivedi, R.C. (2010). Cancer stem cells: an enigma in head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Therapy*, 6(4), 411-3.
- Kendrick, N. (2014). A gene's mRNA level does not usually predict its protein level. *Kendrick Laboratories, Inc., Madison, WI*.
- Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*, 121(6), 823-835.
- Knudson, A.G., Jr, Strong, L.C. and Anderson, D.E. (1973). Heredity and cancer in man. *Prog Medicine and Genetics*, 9, 113-58.
- Kobayashi, T., Maruyama, S., Abé, T., Cheng, J., Takagi, R., Saito, C. and Saku, T. (2012). Keratin 10-positive orthokeratotic dysplasia: a new leucoplakia-type precancerous entity of the oral mucosa. *Histopathology*, 61(5), 910-20.
- Kosunen, A., Pirinen, R., Ropponen, K., Pukkila, M., Kellokoski, J. and Virtaniemi, J. (2007). CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma, *Oral Oncology*, 43(1), 51-9.
- Kudo-Saito, C., Hodge, J.W., Kwak, H., Kim-Schulze, S., Schlom, J. and Kaufman, H.L. (2006). 4-1BB ligand enhances tumor-specific immunity of poxvirus vaccines. *Vaccine*, 5;24(23), 4975-86.

- Kujan, O., Oliver, R.J., Khattab, A., Roberts, S.A., Thakker, N. and Sloan, P. (2006). Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation, *Oral Oncology*, 42(10), 987-93.
- Kumamoto, H. and Ohki, K. (2010). Detection of CD133, Bmi-1, and ABCG2 in ameloblastic tumors. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 39(1), 87-93.
- Kurihara, K., Isobe, T., Yamamoto, G., Tanaka, Y., Katakura, A. and Tachikawa, T. (2015). Expression of BMI1 and ZEB1 in epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 34(2), 771-778.
- Kusumbe, A.P., Mali, A.M. and Bapat, S.A. (2009) CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature. *Stem Cells*. 27(3), 498-508.
- Lewis, J.E., Olsen, K.D. and Sebo, T.J. (1997). Spindle cell carcinoma of the larynx: review of 26 cases including DNA content and immunohistochemistry. *Human Pathology*, 28(6), 664-73.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030-1037.
- Li, X. F., Guo, X. G., Yang, Y. Y. and Liu, A. Y. (2014). Effect of CXCR4 and CD133 co-expression on the prognosis of patients with stage II~ III colon cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 16(3), 1073-1076.
- Lim, W., Kim, H.E., Kim, Y., Na, R., Li, X., Jeon, S. and Choi, H. (2016). Kim O Association between cancer stem cell-like properties and epithelial-to-mesenchymal transition in primary and secondary cancer cells. *International Journal of Oncology*.
- Lin, L., Liu, A, Peng, Z., Lin, H.J., Li, P.K., Li, C. And Lin, J. (2011) STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells. *Cancer Research*, 1;71(23), 7226-37.
- Locke, M., Heywood, M., Fawell, S. and Mackenzie, I.C. (2005). Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines, *Cancer Research*, 65(19), 8944-50.
- Loercher, A., Lee, T.L., Ricker, J.L., Howard, A., Geoghegan, J., Chen, Z., Sunwoo, J.B., Sitcheran, R., Chuang, E.Y., Mitchell, J.B., Baldwin, A.S. and Jr, Van Waes C. (2004) Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Research*. Sep 15;64(18):6511-23. Erratum in: *Cancer Research*, 1;64(21), 8130-2.
- López-Novoa, J.M. and Nieto, M.A. (2009). Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Molecular Medicine*, 1(6-7), 303-14.
- Lotem, I. and Sachs, L. (2006). Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene*. 14;25(59), 7663-72.
- Ma, S. R., Wang, W. M., Huang, C. F., Zhang, W. F. and Sun, Z. J. (2015). Anterior gradient protein 2 expression in high grade head and neck squamous cell carcinoma correlated with cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, 6(11), 8807.

- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. and Weinberg, R.A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 16;133(4), 704-15.
- Mărgăritescu C, Pirici D, Simionescu C, Stepan, A. The utility of CD44, CD117 and CD133 in identification of cancer stem cells (CSC) in oral squamous cell carcinomas (OSCC). (2011) *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 52 (3), 985-93.
- Matsuzaki, S. and Darcha, C. (2012) Epithelial to mesenchymal transition-like and mesenchymal to epithelial transition-like processes might be involved in the pathogenesis of pelvic endometriosis. *Human Reproduction*, 27(3), 712-21.
- Mendelsohn, A.H., Lai, C.K., Shintaku, I.P., Fishbein, M.C., Brugman, K. and Elashoff, D.A. (2012). Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma, *American Journal of Otolaryngology*, 33(1), 6-13.
- Minna, T., Reidar, G., Mika, H. and Matti, K. (2006). Antonio García de Herreros, Ismo Virtanen. Snail-dependent and independent Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Carcinoma Cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(11), 1263-1275.
- Mirghani, H., Amen, F., Moreau, F., Lacau, S.T. and Guily, J. (2015). Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? *Oral Oncology*, 51, 229-236.
- Misra, S., Toole, B.P. and Ghatak, S. (2006) Hyaluronan constitutively regulates activation of multiple receptor tyrosine kinases in epithelial and carcinoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 34936–34941.
- Miyoshi, A., Kitajima, Y., Sumi, K., Sato, K., Hagiwara, A., Koga, Y. and Miyazaki, K. (2004). Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 90, 1265-1273.
- Moon, Y., Kim, D., Sohn, H. and Lim, W. (2016). Effect of CD133 overexpression on the epithelial-to-mesenchymal transition in oral cancer cell lines. *Clinical and Experimental Metastasis*, 33(5), 487-96.
- Nieto, M.A. (2002). The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 155–166.
- Noto, Z., Yoshida, T., Okabe, M., Koike, C., Fathy, M., Tsuno, H., Tomihara, K., Arai, N., Noguchi, M. and Nikaido, T. (2013). CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line. HSC-4 possess cancerstem-like cell characteristics. *Oral Oncology*, 49(8), 787-95.
- Oliveira, L. R., Castilho–Fernandes, A., Oliveira–Costa, J. P., Soares, F. A., Zucoloto, S. and Ribeiro–Silva, A. (2014). CD44+/CD133+ immunophenotype and matrix metalloproteinase-9: Influence on prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck*, 36(12), 1718-1726.

- Omara-Opyene, A.L., Qiu, J., Shah, G.V. and Iczkowski, K.A., (2004). Prostate cancer invasion is influenced more by expression of a CD44 isoform including variant 9 than by Muc18, *Laboratory Investigation*, 84(7), 894–907.
- Ota, I., Masui, T., Kurihara, M., Yook, J. I., Mikami, S., Kimura, T. and Kitahara, T. (2016). Snail-induced EMT promotes cancer stem cell-like properties in head and neck cancer cells. *Oncology Reports*, 35(1), 261-266.
- Polyak, K. and Weinberg, R.A. (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits, *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 265-73.
- Poser, I., Dominguez, D., de Herreros, A.G., Varnai, A., Buettner, R. and Bosserhoff, A.K. (2001). Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 24661–24666.
- Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. **50**: 151–162.
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J. and Dalerba, P. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the Natural Academy of the Sciences the USA*, 104(3), 973-8.
- Ramos-Vara, J.A. and Miller, M.A. (2014). When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry-the red, brown, and blue technique." *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87.
- Reibel, J. (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Critical Reviews of Oral and Biological Medicine*, 14(1), 47-62.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414 (6859), 105-11.
- Richard, V. and Pillai, M.R. (2010). The stem cell code in oral epithelial tumorigenesis: 'the cancer stem cell shift hypothesis', *Biochimica at Biophysica Acta*, 1806(2), 146-62.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111-115.
- Romano, M., DE Francesco, F., Zarantonello, L., Ruffolo, C., Ferraro, G.A., Zanusi, G., Giordano, A., Bassi, N. and Cillo, U. (2016) From Inflammation to Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives. *Anticancer Research*, 36(4), 1447-60
- Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Luber, B., Busch, R., Höfler, H. and Becker, K.F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer, *American Journal of Pathology*, 161(5), 1881-91.

- Sakamoto, K., Imanishi, Y., Tomita, T., Shimoda, M., Kameyama, K., Shibata, K., Sakai, N., Ozawa, H., Shigetomi, S., Fujii, R., Fujii, M. and Ogawa, K. (2012). Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. *Annals of Surgical Oncology*, 19, 612-619..
- Schlamp, K., Weinmann, A., Krupp, M., Maass, T., Galle, P. R. and Teufel, A. (2008). Blot Base: A northern blot database. *Gene*, 427(1–2), 47–50.
- Scully, C. (2014). Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. *Oral Diseases*, 20(1), 1-5.
- Sheridan, C., Kishimoto, H., Fuchs, R.K., Mehrotra, S., Bhat, Nakshatri, P., Turner, C.H., Goulet, R., Jr, Badve, S. and Nakshatri, H. (2006). CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis, *Breast Cancer Research*, 8(5), R59.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2013). “Cancer statistics” *CA Cancer Journal Clinics*, 65, 5-29.
- Slootweg, P.J. and Eveson, J.W. (2005). *Tumors of the oral cavity and oropharynx: introduction*. In: Eveson JW, Reichart, P., Sidransky, D., Barnes, L., editors. Pathology and genetics of head and neck tumors. World Health Organization classification of tumors. Geneva, Switzerland: WHO Press, 230-39.
- Smith, A., Theodoros, N.T. and Quintin, P. (2013). Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, (49), 287-292.
- Speight, P.M. (2007). Update on oral epithelial dysplasia and progression to oral cancer. *Head and Neck Pathology*, 1, 61-66.
- Streit, S., Michalski, C. W., Erkan, M., Kleef, J. and Friess, H. (2009). Northern blot analysis for detection of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nature Protocols*, 4 (1), 37–43.10
- Su, C.C. and Ho, H.C. (2007). Neck mass with epithelial papillae: a diagnostic pitfall in aspiration cytology. *Otolaryngol Head and Neck Surgery*, 137(6), 979-80.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(4), 820-824.
- Taipale, J. and Beachy, P.A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer, *Nature*, 411(6835), 349-54.
- Taniguchi, M., Miura, K., Iwao, H. and Yamanaka, S. (2001). Quantitative Assessment of DNA Microarrays – Comparison with Northern Blot Analysis. *Genomics*, 71 (1), 34–39.
- Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies, *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 740-6.

- Thompson, L.D., Wenig, B.M., Heffner, D.K. and Gnepp, D.R. (1999). Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases. *Otolaryngol Head and Neck Surgery*, 120(5), 718-24.
- Thomson, P.J., Hamadah, O., Goodson, M.L., Cragg, N. and Booth, C. (2008). Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(5), 370-5.
- Toporcov, T.N., Znaor, A., Zhang, Z.F., Yu, G.P., Winn, D.M., Wei, Q., Vilensky, M., Vaughan, T., Thomson, P., Talamini, R., Szeszenia-Dabrowska, N., Sturgis, E.M., Smith, E., Shangina, O., Schwartz, S.M., Schantz, S., Rudnai, P., Richiardi, L., Ramroth, H., Purdue, M.P., Olshan, A.F., Eluf-Neto, J., Muscat, J., Moyses, R.A., Morgenstern, H., Menezes, A., McClean, M., Matsuo, K., Mates, D., Macfarlane, T.V., Lissowska, J., Levi, F., Lazarus, P., La Vecchia, C., Laggiou, P., Koifman, S., Kjaerheim, K., Kelsey, K., Holcatova, I., Herrero, R., Healy, C., Hayes, R.B., Franceschi, S., Fernandez, L., Fabianova, E., Daudt, A.W., Curioni, O.A., Maso, L.D., Curado, M.P., Conway, D.I., Chen, C., Castellsague, X., Canova, C., Cadoni, G., Brennan, P., Boccia, S., Antunes, J.L., Ahrens, W., Agudo, A., Boffetta, P., Hashibe, M., Lee, Y.C. and Filho, V.W. (2015). Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *International Journal of Epidemiology*, 44(1), 169-85.
- Valdés, F., Alvarez, A.M., Locascio, A., Vega, S., Herrera, B., Fernández, M., Benito, M., Nieto, M.A. and Fabregat, I. (2002). The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes. *Molecular Cancer Research*, 1(1), 68-78.
- Visvader, J.E. and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 755-68.
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45(4-5), 309-16.
- Watanabe K., Petro, B.J., Shlimon, A.E. and Unterman, T.G. (2008). Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Periodontology*, 79:1208-1216
- Weitkunat, R., Sanders, E. and Lee, P.N. (2007). Metaanalysis of the relation between European and American smokeless tobacco and oral cancer [serial online]. *BMC Public Health*, 7, 334.
- World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & genetics. Head and neck tumours. *International Agency for Research on Cancer (IARC)*. In: Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D., eds. Head and neck tumors. Lyon: IARC Press, 2005;177-80
- Wicki, A. and Christofori, G. (2007). The potential role of podoplanin in tumour invasion. *British Journal of Cancer*, 15;96(1), 1-5.
- Wu, K. and Bonavida, B. (2009). The activated NF-kappaB-Snail-RKIP circuitry in cancer regulates both the metastatic cascade and resistance to apoptosis by cytotoxic drugs. *Critical Reviews of Immunology*, 29(3), 241-54.

- Wu, T., Hong, Y., Jia, L., Wu, J., Xia, J., Wang, J., Hu, Q. and Cheng, B. (2016) Modulation of IL-1 β reprogrammes the tumor microenvironment to interrupt oral carcinogenesis. *Scientific Reports*, 1;6, 20208.
- Yang, A.D., Fan, F., Camp, E.R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R., Gray, M.J., Cheng, H., Hoff, P.M. and Ellis, L.M. (2006). Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*,. 15;12 (14-1), 4147-53
- Yu, J.W., Zhang, P., Wu, J.G., Wu, S.H., Li, X.Q., Wang, S.T., Lu, R.Q., Ni, X.C. and Jiang, B.J. (2010). Expressions and clinical significances of CD133 protein and CD133 mRNA in primary lesion of gastric adenocarcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 7;29:141
- Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M.B., Rieder, F., Tanjore, H. and Kalluri, R. (2007). Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biology and Chemistry*, 10;282(32), 23337-47.
- Zhang, Q., Shi, S., Yen, Y., Brown, J., Ta, J.Q. and Le, A.D. (2010). A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy, *Cancer Letters*, 289(2), 151-60.
- Zhang, Z., Filho, M.S. and Nor, J.E. (2012). The biology of head and neck cancer stem cells, *Oral Oncology*, 48(1), 1-9.
- Zhu, L. F., Hu, Y., Yang, C. C., Xu, X. H., Ning, T. Y., Wang, Z. L. and Liu, L. K. (2012). Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Laboratory investigation*, 92(5), 744-752.



EKLER

Ek-1.Etik Kurul Raporu



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı: 25901600
Konu: Toplantı Kararları

.../11/2013

Sayın *Prof.Dr. Sibel Zilif Goltekin*
Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 7 Ekim 2013 tarihinde yapmış olduğu toplantı kararları ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr.Cengiz Bekir DEMİREL
Dekan Yardımcısı

EK-1 Etik Kurul kararı (1 sayfa)

Ek-1. (devam) Etik Kurul Raporu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU										
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU										
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu								
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara								
	TELEFON	0312 202 69 58								
	FAKS	0312 202 46 73								
E-POSTA	iletikkurul@gazi.edu.tr									
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kanser kök hücre varlığının oral kanser ve oral displazilerdeki yeri								
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Sibel EHF GÖLTEKİN								
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI BULUNDUĞU MERKEZ	G.Ü.Dış Hek.Fak.								
	DİSTEKLEYİCİ (Varsa)									
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya,mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya in vivo in vitro tetkik tahlil ve tedavi işlemleri arasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Dosya ve görüntü kayıtları kullanılarak yapılan retrospektif çalışmalar veya arızlı araştırmalar-Doktora Tezi								
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ	<input type="checkbox"/>	ULUSAL	<input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI	<input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	DİLİ						
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe	<input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>	
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU			Türkçe	<input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce	<input type="checkbox"/>	Diğer	<input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		<input checked="" type="checkbox"/>							
	BEYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU		<input type="checkbox"/>							
	DİĞER		<input type="checkbox"/>							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:	142							Toplantı tarihi:	07.10.2013
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlere gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü.Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.									
GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU										
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), İy Klinik Uygulamalar Kılavuzu									
BASKANIN ÜNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Canan ULUOĞLU									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kararını	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Katılım +		İmza	
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU/BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.Y.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmış	
Ünvan Dr.Canan GÜNERCİN BAŞKAN YARD	Tıp Etiği	Y.rnh. Prof.Dr. Yavuz M.İBİN AÇSAP Merh.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>		
Prof.Dr.Genç AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji A.D	G.Ü.Y.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>		

Ek-1. (devam) Etik Kurul Raporu

Prof.Dr.Hakan BOYACI ÜYE	Kardiyoloji A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Nehir AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Mehmet Akif ÖZTÜRK ÜYE	İç Hastalıkları A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Ehvan İŞERİ ÜYE	Çocuk Psikiyatrisi A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Arzu BAKIRTAŞ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast.A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Nihal TURAN DURAL ÜYE	Farmakoloji A.D	G.Ü.E.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Hakan KAPALI ÜYE	Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D	Fahs Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Cengiz Bekir DEMİREL ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Osman YÜKSEL ÜYE	Genel Cerrahi A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Hakan KAYIR ÜYE	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.A.T.A	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Öğr.Gör.Ahmet GELİR ÜYE	Anakart	G.Ü.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Emine ŞEKİR ÜYE	Sivil Tıp Bilimi	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

* Araştırma ile ilgili
** Toplamda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZER YÜCEL, Özlem
 Uyuşu : TC.
 Doğum tarihi ve yeri : 12.04.1978 / Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : (0312) 203 43 83
 e-mail : ozleazertr@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Anabilim Dalı	2011-Devam Ediyor
Doktora	Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi/Periodontoloji	2002-2007
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	1995-2000

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011- Devam Ediyor	Gazi Üniversitesi Oral Patoloji	Ar.Gör.
2013 – 2014	GATA Patoloji Anabilim Dalı	Ziyaretti Araştırmacı
2008 – 2008	Başkent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi/ Periodontoloji	Uzman Dr.
2002 – 2007	Hacattepe Üniversitesini Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji	Ar.Gör

Yabancı Dil

İngilizce

Projeler

- Özer-Yücel, Ö. (2004-2007). *Hacettepe Üniversitesi Arastırma Fonu: "İleri Periodontal Yıkım Olan Bireylerde Interlökin-1 beta ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa Gen Polimorfizmlerinin ve Diseti Olugu Sıvısı Düzeylerinin Belirlenmesi"*, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2005-2006). 105S013 SBAG-HD-17, "Farklı Siddettedeki Ortodontik Kanin Distalizasyon Kuvvetlerinin Diseti Olugu Sıvısı Interlökin-1?, Tümör Nekrozis Faktör-? ve Interlökin-10 Düzeylerinin Etkilerinin Karsılaştırılması", Tübitak Projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2005-2007). *Hacettepe Üniversitesi Arastırma Fonu: 05/20, "Periodontal hastalık patogenezinde proinflatuar/ anti-inflatuar (interlökin-1 beta/interlökin-11) sitokin dengesinin immünregülasyondaki rolünün belirlenmesi"*, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2007-2009). *Hacettepe Üniversitesi Arastırma Fonu: "Farklı bleaching yöntemlerinin diseti klinik parametreleri ve diseti olugu sıvısı interlökin-1 beta ve interlökin-10 düzeyleri üzerindeki etkisi"*, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2011-2012). *Ankaferd Blood Stopper®'ın Erken Dönem Kemik Dokusu İyilemesi Üzerine Etkisinin Histopatolojik Değerlendirmesi: Ratlar Üzerinde Deneysel Çalışma*. Ankara Üniversitesi Dis Hekimliği Fakültesi, Arastırma Projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2011-2012). *Osteora®'nın Erken Dönem Kemik Dokusu İyilemesi Üzerine Etkisinin Histopatolojik Değerlendirmesi: Ratlar Üzerinde Deneysel Çalışma*. Ankara Üniversitesi Dis Hekimliği Fakültesi, Arastırma Projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2011-2012). *Periodontitis olusturulmuş diabetik ratlarda diseti kollajen IV, laminin 5, MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesi*, Arastırma Projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2014). *3001 Baslangıç Ag-Ge Projeleri Destekleme Programı 114S891 "Kanser Kök Hücre Varlığının Oral Kanser ve Oral Displazideki Yeri"*, Tübitak Projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2015). "Th1/Th2/Th17 hücrelerinin ilaca bağlı dis eti büyümelerine olan etkisinin in vivo ve in vitro bulgularla değerlendirilmesi", Tübitak Projesi.
- Özer-Yücel, Ö. (2015). *GATA Bilimsel Arastırma Kurulu AR-2015/16 Immünsüpresif ratlarda dis çekimi sonrası yara iyilemesi üzerine melatonin ve D vitamininin etkilerinin değerlendirilmesi*. Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Arastırmacı.
- Özer-Yücel, Ö. (2015). *GATA Bilimsel Arastırma Kurulu AR-2015/17 Zoledronik asit uygulanan ratlarda ozon ve lazer terapinin dis çekimi sonrası yara bölgesine etkisinin değerlendirilmesi*, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi.

Özer-Yücel, Ö. (2016). *Oral skuamöz hücreli karsinom ve displazilerde Kaspaz4 gen ekspresyonu ve DFF45, Ki67 ve bcl2 ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak incelenmesi*, Arastırma Projesi.

Bilimsel Kuruluslara Üyelikler

Ankara Dishekimleri Odası, Üye, 2012.

Ankara Patoloji Derneği, Üye, 2012.

Türk Dishekimleri Birliği, Üye, 2002.

Türk Periodontoloji Derneği, Üye, 2002.

Ödüller

TÜBİTAK BİDEB-2224 bursu (Yurt dısı etkinlik bilim insanı destekleme bursu), TÜBİTAK, 2012.

TÜBİTAK bilimsel yayın tesvik ödülü, TÜBİTAK, 2008.

Türk İmmünoloji Derneği Kongre Bursu, Türk İmmünoloji Derneği, 2003.

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Fırat, E., Ercan, E., Gürđan, S., Özer-Yücel, Ö., Yalçın-Çakır, F. ve Berker, A. E. (2011). The effect of bleaching systems on the gingiva and the levels of IL-1beta and IL-10 in gingival crevicular fluid. *Operative Dentistry*, 36(6), 572-80.

Özer-Yücel, Ö. (2015). Inflammatory cytokines and the pathogenesis of periodontal disease. *Immunome Research*, 11(2).

Özer-Yücel, Ö., Berker, A. E., Mescı, L., Eratalay, Y. K., Tepe, E ve Tezcan, F. I. (2015). Analysis of TNF-alpha (-308) polymorphism and gingival crevicular fluid TNF-alpha levels in aggressive and chronic periodontitis: A preliminary report. *Cytokine*, 72(2), 173-177.

Özer-Yücel, Ö., Berker, A., Ezel, M. L., Eratalay, Y. K., Tepe, E. ve Tezcan, F. I. (2013). Association of interleukin-1 beta (+3954) gene polymorphism and gingival crevicular fluid levels in patients with aggressive and chronic periodontitis. *Genetic Counseling*, 24(1), 21-25.

Özer-Yücel, Ö., Berker, A.E., Garıboğlu, S. ve Otlı, H. (2008). Interleukin-11, interleukin-1beta, interleukin-12 and the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 365-370.

Sengüven, B., Barıs, E., Yıldırım, B., Shuıbat, A., Özer-Yücel, Ö., Yıldız, Y., Büyük, Ö., Museyibov, F. ve Gültekin, S. E. (2015). Oral mucosal lesions: a retrospective review of one institution's 13-year experience. *Turkish Journal Of Medical Sciences*, 45, 241-245.

Sengüven, B., Tükel, H. C., Özer-Yücel, Ö. ve Günhan, Ö. (2014). Primary multinodular oral kaposi's sarcoma- HIV seronegative young patient: report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology*, 27, 442-45.

Tözüm, T. F., Berker, A. E., Akıncıbay, H., Özer, Ö., Aktas, D., Tezcan, F.I., Sekerci, S., El H., Eratalay, Y.K. ve Tunçbilek, E. (2005). Oral and Periodontal features of Diploid-Tetraploid Masoicism. *Journal of Periodontology*, 76(9), 1567-71.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

Akman, A.C., Ilarslan, Y. D., Dursun, E., Demir, B. ve Özer-Yücel, Ö. (2015). *5 year follow up of dental implants in two siblings with Ligneous periodontitis: a risk for periimplantitis?*. Europerio 8.

Çiçek, A. F., Özer-Yücel, Ö., Aydın, Ü., Karakoç, Ö. ve Günhan, Ö. (2014). Cementoblastoma or osteosarcoma? A case report. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. (Poster).

Emecen, P., Akman, A. C., Özer, Ö., Hakkı, E. E., Demiralp, B., Hakkı, S. ve Nohutcu, R. M. (2005). *The Effect of Pepsin In Periodontal Ligament Cells, In Vitro*. CED NOF Divisions of IADR (Poster).

Germeç, D., Özer-Yücel, Ö., Kocadereli, I. ve Berker, A. E. (2006). *The Effects of Orthodontic Forces On Cytokines During Canine Distalization*. The Congress of European Orthodontic Society (Poster).

Gülçiçek, T., Akün, E. ve Özer-Yücel, Ö. (2015). *Peri-implant soft tissue management in the esthetic zone using large tuberosity connective tissue graft by punch technique: Report of a case with 3 year follow-up*. Europerio 8.

Gültekin, S. E., Sengüven, B., Barış, E., Özer-Yücel, Ö., Soluk-Tekkesin M., Günhan Ö. ve Etit, D. (2014). *Odontogenic Tumours: A Multicentric Retrospective Study of ~ 2000 Cases in Turkish Population*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine (Poster).

Gürkan, S., Özer-Yücel, Ö., Fırat, E. ve Ercan, E. (2008). *The Effect of Bleaching Systems on the Gingiva and the Levels of IL-1 β and IL-10 in Gingival Crevicular Fluid..* 86th General Session & Exhibition of the IADR 32nd Meeting of the CADR. (Poster).

Hasanoglu-Erbasar, G. N., Peker, E. ve Özer-Yücel, Ö. (2013). *An Unusual Presentation of Mandibular Odontogenic Keratocyst: A Diagnostic Dilemma*. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (Poster).

Kan, G., Özer-Yücel, Ö., Çavdar, F., Çağlayan, F. ve Çağlayan, G. (2007). *Examination of serum and parotid saliva zinc levels and the phagocytic activity of the PMNs in aggressive and chronic periodontitis patients*. Congress of BASS (Poster).

Min, S.J., Emecen, P., Özer-Yücel, Ö., Yılmaz, E. ve Walters, J.D. (2008). *Association of Interleukin-1B Gene Polymorphisms and Haplotype Structure with Periodontitis*. American Association of Dental Research Annual Meeting (Poster).

- Özer, Ö., Berker, A., Ezel, M.L., Ersoy, F., Sanal, Ö., Eratalay, Y.K., Tepe, E. ve Tezcan, F.I. (2004). IL-1beta and TNF-alpha Gene Polymorphisms in Turkish Population. IADR-CED-NOF-ID (Poster).
- Özer-Yücel, Ö. (2014). *Hyperplastic recurrent oral HSV-1 infection. "Slide seminar on challenging oral pathology cases"*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine (Sözlü Bildiri).
- Özer-Yücel, Ö. (2014). *Oral mucosal lesion showing concurrent lichenoid and granulomatous inflammation. "Slide seminar on challenging oral pathology cases"*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. (Sözlü Bildiri).
- Özer-Yücel, Ö. ve Günhan, Ö. (2014). *Rod-like calcifications: A clue for diagnosis of specific entities*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. (Poster).
- Özer-Yücel, Ö., Barıs, E., Demir, B., Yıldırım, Y. ve Akman, A. C. (2013). *Dental Implant Therapy In Ligneous Periodontitis Patients: 5 years follow-up..* 46th Meeting of the Continental European Division of the the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division (NOF) (Poster).
- Özer-Yücel, Ö., Berker, A. E., Gariboglu, S. and Otlu, H. (2008). *Interleukin-11, interleukin-1?, and the pathogenesis of periodontal inflammation*. American Association of Dental Research Annual Meeting (Poster).
- Özer-Yücel, Ö., Gültekin, S. E., Sengüven, B., Özdemir, S.P., Kurtis-Mazlum, B. ve Koch, M.(2012). *The effect of periodontal inflammation on collagen IV, laminin 5, MMP-2, and MMP-9 expression in gingival tissues of diabetic rats..Europerio7., 39(Suppl 13), 1-429.* (Sözlü Bildiri).
- Özer-Yücel, Ö., Yıldırım, Y. ve Akman, A. C. (2013). *The fate of dental implants in a patient receiving IV zoledronic acid treatment*. European Association of Osseointegration 22nd Annual Scientific Meeting (Poster).
- Özer-Yücel, Ö., Gariboglu, S. ve Berker, A. E. (2005). *Interleukin-12 Levels In Gingival Crevicular Fluid In Periodontal Disease*. Europerio5 (Poster).
- Sengüven, B., Barıs, E., Yıldırım, B., Shuibat, A., Özer-Yücel, Ö., Museyibov, F., Yıldız, Y., Büyük, Ö. ve Gültekin, S. E. (2014). *Oral mucosal lesions: a retrospective review of one institution's 13-year experience*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine
- Sengüven, B., Özer-Yücel, Ö., Yıldırım, B., Gültekin, S. E., Günhan, Ö., Barıs E., Kahraman, S. ve High, A. (2014). *Challenging diagnosis of a palatal submucosal lesion*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. (Poster).
- Sengüven, B., Tükel, H. C., Özer-Yücel, Ö. ve Günhan, Ö. (2014). *Primary Multinodular Oral Kaposi's Sarcoma- HIV SeroNegative Young Patient: a case report*. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine. (Poster).

Tözüm, T.F., Özer, Ö., Berker, A. E., Akıncıbay, H., Aktas, D., Sekerci, S., Tezcan, F. I., Eratalay, Y. K., Tunçbilek, E. (2004). Oral and Periodontal features of Diploid-Tetraploid Masoicism. IADR-CED-NOF-ID (Poster).

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Akman, A.C., Ilarslan, Y. D., Özer-Yücel, Ö. ve Dursun E. (2015). Periodontal Rejenerasyonun Biyolojik Prensipleri. *Türkiye Klinikleri Periodontoloji Özel Dergisi Rejeneratif Periodontal Tedavi Yaklaşımları Özel Sayısı*, 1(2), 1-9.

Özer, Ö. ve Demiralp, B. (2005). Periodontitis kalp hastalığına neden olur mu?. *Atatürk Üniversitesi Dishekimligi Fakültesi Dergisi*, 15(2), 62-70.

Özer-Yücel, Ö. ve Ercan, E. (2009). Periodontal Conditions and Mucogingival Surgical Treatment of A Patient with Scleroderma. *Hacettepe Dis Hekimligi Fakültesi Dergisi*, 33(1), 62-70.

Özer-Yücel, Ö. ve Gültekin, S. E. (2014). Periodontal Hastalıkların Periodontal Dokulardaki Biyobelirteçleri. *Türkiye Klinikleri Dishekimligi bilimleri Özel Dergisi Periodontal ve Peri-implant Doku Hastalıklarının Biyolojik Sınırlardaki Belirteçleri Özel Sayısı*, 5(1), 41-47.

Özer-Yücel, Ö. ve Gültekin, S. E. (2015). Dental kök hücrelerin rejeneratif medikal tedavideki yeri. *Acta Odontologica Turcica*, 32(2), 98-105.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Akman, A. C., Özer-Yücel, Ö., Demiralp, B., Muhtarogulları, M., Akıncıbay, H., Eratalay, Y. K. ve Berker, A.E. (2008). *Bir PLS Hastasının Immunolojik Bulguları ve Implant Destekli Tedavisi: Olgu Bildirimi*. Türk Periodontoloji Derneği 38. Bilimsel Kongresi.

Demir, B., Akman, A.C., Yıldırım, Y., Barış, E. ve Özer-Yücel, Ö. (2012). *Lignöz Periodontitis Hastalarında Implant Tedavisinin Klinik ve Histopatolojik Degerlendirilmesi: Olgu Bildirimi*. Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22. Sempozyumu, Ankara.

Eroglu, Z., Alaylı, M., Arpak, N., Gültekin, S. E. ve Özer-Yücel, Ö. (2012). *Osteora®'nın Erken Dönem Kemik Dokusu İyilemesi Üzerine Etkisinin Histopatolojik Degerlendirmesi: Ratlar Üzerinde Deneysel Çalışma*. Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22. Sempozyumu, Ankara.

Eroglu, Z., Alaylı, M., Arpak, N., Gültekin, S.E. ve Özer-Yücel, Ö. (2012). *Ankaferd Blood Stopper®'in Erken Dönem Kemik Dokusu İyilemesi Üzerine Etkisinin Histopatolojik Degerlendirmesi: Ratlar Üzerinde Deneysel Çalışma*. Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22. Sempozyumu, Ankara, (Kontrol No: 2738630)

Ilarslan, Y. D., Özer-Yücel, Ö., Süme-Kesir, S.S. ve Berker, A. E. (2016). *Diseti Büyümesi Benzeri Travmatik Fibrom Olgusu: Klinik ve Histopatolojik Bulgular*. Türk Periodontoloji Derneği 45. Bilimsel Kongresi Sheraton Kongre Merkezi.

Özer Ö., Mesci, L., Berker, A. E., Ersoy, F., Sanal, Ö., Eratalay, Y.K., Tepe, E. ve Tezcan, F. I. (2003). *Ileri Periodontal Yıkım Olan Bireylerde IL-1beta and TNF-alfa Gen*

Polimorfizmleri ve Diseti Olugu Sıvısı Düzeylerinin Belirlenmesi. XI.Ulusal Immünoloji Kongresi.

Özer-Yücel, Ö. ve Ercan, E. (2006). *Sklerodermalı Bir Hastada Periodontal Bulgular ve Tedavi Yaklaşımı: Bir Olgu Bildirimi.* Türk Periodontoloji Derneği 36. Bilimsel Kongresi.

Özer-Yücel, Ö., Berker, A. E., Ersoy, F., Sanal, Ö., Eratalay, Y.K., Tepe, E. ve Tezcan, F. I. (2008). *İleri Periodontal Yıkım Olan Bireylerde Interlökin-1 beta ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa Gen Polimorfizmlerinin ve Diseti Olugu Sıvısı Düzeylerinin Belirlenmesi.* Türk Periodontoloji Derneği 38. Bilimsel Kongresi.

Özer-Yücel, Ö., Gültekin, S. E., Sengüven, B., Özdemir, S. P., Koch, M., Kurtis, M. B. (2012). *Periodontitis olusturulmuş diabetik ratlarda diseti kollajen IV, laminin 5, MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin immünhistokimyasal olarak belirlenmesi.* Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22. Sempozyumu, Ankara,

Sengüven, B., Barıs, E., Yıldırım, B., Shuibat, A., Özer-Yücel, Ö., Museyibov, F., Yıldız Y., Büyük, Ö. ve Gültekin, S. E. (2012). *Oral Mukozal Lezyonların Klinik- Patolojik Olarak Değerlendirilmesi.* Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22. Sempozyumu, Ankara.

Sengüven, B., Gültekin, S. E., Tokman, B., Shuibat, A., Museyibov, F. ve Özer-Yücel, Ö. (2012). *Bas-Boyun Bölgesinin Synovial Sarkomları: 2 Olgu Sunumu.* 22. Ulusal Patoloji Kongresi, Antalya.

Yayın Hakemligi

Dergi Alan endeksleri, International Journal of Genomic Medicine, Hakemlik Sayısı:1.

Dergi SCI, Archives of Oral Biology, Hakemlik Sayısı:2.

Dergi SCI, Journal of Periodontology, Hakemlik Sayısı:1.

Sertifika

17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, Bilimsel kongre, Harbiye Askeri Müzesi, Sertifika, 25.05.2015 -30.05.2015 (Uluslararası).

46th Meeting of the Continental European Division of the the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division (NOF), Bilimsel Kongre, İtalya, Sertifika, 04.09.2013 -07.09.2013 (Uluslararası).

Academy of Osseointegration's 22nd Annual Meeting, Bilimsel kongre, San Antonio, Sertifika, 08.10.2007 -10.10.2007 (Uluslararası).

Academy of Osseointegration's 22nd Annual Meeting, Verification of Participation in Continuing Education Activity, San Antonio, Kurs, 08.10.2007 -10.10.2007 (Uluslararası).

BIOMED 2004 11th International Biomedical Science and Technology Days, Bilimsel kongre, Hacettepe.

- CED NOF Divisions of IADR, Bilimsel kongre, Amsterdam, Sertifika, 14.09.2005 - 17.09.2005 (Uluslararası).
- Çalıştay Hacettepe Dishekimligi Fakültesi 1. Bilim Günleri, Bilimsel toplantı, Hacettepe Dishekimligi Fakültesi, Çalıştay, 31.01.2006 -03.02.2006 (Ulusal).
- European Academy of Osseointegration 2012 Annual Scientific Meeting, Bilimsel kongre, Danimarka, Sertifika, 10.10.2013 -13.10.2013 (Uluslararası).
- Europerio5, Bilimsel kongre, Madrid, Sertifika, 29.06.2006 -01.07.2007 (Uluslararası).
- Europerio7, Bilimsel kongre, Viyana, Sertifika, 06.06.2012 -09.06.2012 (Uluslararası).
- Europerio8, Bilimsel Kongre, Excel London, Sertifika, 03.06.2015 -06.06.2015 (Uluslararası).
- Gazi Üniversitesi Dishekimligi Fakültesi 2. Uluslararası Bilimsel Kongresi, Bilimsel Kongre, Ankara, Sertifika, 04.06.2001 -06.06.2001 (Uluslararası).
- Hastane Enfeksiyonları Kongresi, Bilimsel kongre, Sheraton Hotel, Sertifika, 06.04.2006 - 09.04.2006 (Ulusal).
- IADR-CED-NOF-ID, Bilimsel kongre, Istanbul, Sertifika, 25.08.2004 -28.08.2004 (Uluslararası).
- Kurs Patoloji Kıs Okulu , Eğitim, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi., Kurs, 02.03.2013 - 17.03.2013 (Ulusal).
- Meffert Implant Institute (ICOI Implant Institute) Advanced Surgical & Prosthetic Technique Course for Long Term Implant Success, Eğitim, The Marmara, Kurs, 16.10.2005 -18.10.2005 (Uluslararası).
- Osseointegrasyon Akademisi Derneği 2. Osseointegrasyon Kongresi, Bilimsel kongre, Swiss Hotel, Sertifika, 17.10.2003 -18.10.2003 (Ulusal).
- Türk Periodontoloji Derneği 12. Bilimsel Sempozyumu, Sempozyum, Selçuk Üniversitesi, Sertifika, 25.10.2002 -26.10.2002 (Ulusal).
- Türk Periodontoloji Derneği 32. Bilimsel kongresi, Bilimsel kongre, Club med, Sertifika, 15.05.2002-18.05.2002 (Ulusal).
- Türk Periodontoloji Derneği 42. Bilimsel Kongresi ve 22. Sempozyumu, Bilimsel kongre, Sheraton Hotel, Sertifika, 08.10.2012 -10.10.2012 (Ulusal).
- Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sertifika, 06.09.2004 -09.09.2004 (Uluslararası).
- XI.Ulusal İmmünoloji Kongresi, Bilimsel kongre, Kusadası, Sertifika, 08.10.2003 - 11.10.2003 (Ulusal).



GAZİ GELECEKTİR..