

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ORAL KAVİTENİN MALİN VE PREMALİN
LEZYONLARINDA TUBULİN FOLDING COFACTOR D
(TBCD) GENİNİN GENETİK VE EPİGENETİK
PROFİLİNİN İNCELENMESİ

BEGÜM BÜRKE BULUŞLU

DANIŞMAN
PROF.DR. SEMRA DEMOKAN

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ PROGRAMI

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN**BEYAN**

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

Begüm Bürke Buluşlu



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz Sayın **Prof. Dr. Ahmet KİZİR**'e,

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

Yüksek lisans eğitimim süresince tüm bilgi ve birikimini benden esirgemeyen; tez çalışmam boyunca çalışmalarımı yönlendiren, fikir ve önerileriyle bana her daim yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Semra DEMOKAN**'a,

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

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

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım **Sena ŞEN, Kübra Gizem ESENTÜRK YAYLA, Metehan KARATAŞ, Fulya KARAYEĞİT, Nadin BEDİKYAN, Işıl Melis ZÜMRÜT** ve **Hüseyin Enes DERYA**'ya,

Tüm eğitim sürecim boyunca maddi ve manevi her zaman yanımda olan, tavsiye ve özverilerini eksik etmeyen ve her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem **Filiz BULUŞLU**, teyzem **Nagehan BULUŞLU**, anneannem **Sıtkıye BULUŞLU** ve dedem **Hakkı BULUŞLU**'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-35409

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	12
ABSTRACT.....	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. ORAL KAVİTENİN ANATOMİK YAPISI.....	16
2.2. ORAL KAVİTEDE PREMALİN DEĞİŞİKLİKLER VE DİSPLAZİ KAVRAMI.....	17
2.3. ORAL KAVİTENİN PREMALİN LEZYONLARI.....	18
2.4. ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM (OSCC)	24
2.4.1. Epidemiyoloji.....	24
2.4.2. Etyoloji ve Risk Faktörleri.....	25
2.4.3. Histopatoloji.....	27
2.4.4. Evreleme ve Prognoz	27
2.4.5. Tanı ve Tedavi	29
2.5. ORAL KAVİTE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ	30
2.5.1. Genetik Değişiklikler	30
2.5.2. Gen-Çevre Etkileşimi, Epigenetik Değişiklikler ve Biyobelirteç Kavramı	32
2.6. Mikrotübül Organizasyonunda Rol Oynayan <i>Tubulin Folding Cofactor D (TBCD)</i> Geni.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. MATERYAL	41
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	41
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Karışımlar	42
3.2. YÖNTEMLER.....	43
3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi	43
3.2.1.1. Doku Eldesi.....	43
3.2.1.2. Serum Eldesi	43
3.2.1.3. Tükürük Eldesi	43
3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri	44
3.2.2.1. Dokudan DNA İzolasyonu.....	44
3.2.2.2. Serumdan DNA İzolasyonu	45
3.2.3. Total RNA İzolasyonu	46
3.2.4. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı	47
3.2.5. Metilasyon Analizi.....	48
3.2.5.1. Bisülfid Modifikasyon İşlemi	48
3.2.5.2. <i>TBCD</i> geninin relatif metilasyon seviyesinin QMSP ile belirlenmesi.....	49
3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi.....	50
3.2.6.1. <i>TBCD</i> Geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi	51
3.2.7. Veri Analizi.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Demografik ve Klinik Özellikler	53
4.2. <i>TBCD</i> Geninin Ekspresyon Analizinin Sonuçları	55
4.3. <i>TBCD</i> Geninin Metilasyon Analizinin Sonuçları	72
4.4. Ekspresyon ve Metilasyon Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi	78
5. TARTIŞMA	88
KAYNAKLAR	93
HAM VERİLER	108
FORMLAR	109
ETİK KURUL KARARI	111
PATENT HAKKI İZNİ	113
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	114
ÖZGEÇMİŞ	115

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, oral kavite tümörleri TNM evrelemesi

Tablo 2-2: Kanser hücrelerinde meydana gelen epigenetik değişimler ve sonuçları

Tablo 2-3: Farklı kanser tiplerine göre promotor bölgelerinde metilasyon gözlenen genler ve bu genlerin fonksiyonları

Tablo 2-4: Oral likenoid displazi tümör-normal doku karşılaştırmasında *TBCD* genine ait beta ve fold change değerleri

Tablo 3-1: Deneylerin gerçekleştirilmesi için kullanılan kimyasal karışımlar ile içerikleri

Tablo 3-2: Dokudan DNA izolasyon işlemi

Tablo 3-3: Serumdan DNA izolasyon işlemi

Tablo 3-4: RNA izolasyon işlemi

Tablo 3-5: Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *TBCD* geninin primer ve prob tasarımı.

Tablo 3-6: Referans *ACTB* geninin primer ve prob tasarımı

Tablo 3-7: Bisüfit DNA dönüşüm protokolü

Tablo 3-8: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon karışımı

Tablo 3-9: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon koşulları.

Tablo 3-10: cDNA sentezi reaksiyon karışımı

Tablo 3-11: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

Tablo 3-12: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı

Tablo 3-13: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon koşulları

Tablo 4-1: Çalışmaya katılanların demografik özellikleri

Tablo 4-2: Malin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri

Tablo 4-3: Premalin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri

Tablo 4-4: OSCC ve OPML gruplarındaki tümör-eşlenik normal-sağlıklı dokularda *TBCD* geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri

Tablo 4-5: OSCC ve OPML gruplarındaki serum-tükürük örneklerinde *TBCD* geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri

Tablo 4-6: OSCC hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları

Tablo 4-7: OPML hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları

Tablo 4-8: OLD tanılı hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Oral kavitenin anatomik yapısı

Şekil 2-2: Oral kavite karsinogenezinde çok aşamalı progresyon

Şekil 2-3: OSCC progresyonu sırasında ortaya çıkan bazı genetik ve anormal metilasyon değişiklikleri

Şekil 2-4: Yüksek ökaryotlarda tübülün heterodimer birleşim yolunun şematik gösterimi.

Şekil 4-1: Hastalara ait örneklerin hedef gen (*TBCD*) ve referans gendeki (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri

Şekil 4-2: OSCC hastalarına ait tümör-eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri

Şekil 4-3: OPML hastalarına ait tümör-eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri

Şekil 4-4: Sağlıklı mukoza, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri

Şekil 4-5: OSCC ve OPML hastalarına ait dokularda relatif olarak hesaplanan ekspresyon düzeylerine ait artma ve azalma sayılarının gösterimi

Şekil 4-6: Malin hasta grubunda evrelere göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyindeki azalış

Şekil 4-7: Malin hasta grubunda erken evre (I-II) ve geç evreye (III-IV) göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimler

Şekil 4-8: OSCC/OPML hasta gruplarının tümör, eşlenik normal dokuları ile serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylerin mukoza, serum ve tükürük örneklerinin ortalama ΔC_t değerleri ile $2^{-\Delta \Delta C_t}$ değerleri hesabının gösterimi

Şekil 4-9: Malin hasta grubunda anatomik tutulumu göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyindeki değişim seviyeleri

Şekil 4-10: Premalin hasta grubu patolojilerine göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyindeki değişim seviyeleri

Şekil 4-11: Malin ve premalin hasta grubunda sigara tüketimine göre ekspresyon değerlerindeki değişim

Şekil 4-12: Malin ve premalin hasta grubunda alkol tüketimine göre ekspresyon değerlerindeki değişim

Şekil 4-13: (A) Malin grupta tümör ile eşlenik normal dokularında *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grupta tümör ile sağlıklı normal dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi

Şekil 4-14: (A) Malin grupta tükürük ile sağlıklı tükürükte *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grupta serum ile sağlıklı serumda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

Şekil 4-15: (A) Premalin grupta tümör ile eşlenik normal dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Premalin grupta tümör ile sağlıklı normal dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

Şekil 4-16: (A) Premalin grupta tükürük ile sağlıklı tükürükte *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Premalin grupta serum ile sağlıklı serumda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

Şekil 4-17: Hedef genin (*TBCD*) amplifikasyon eğrileri

Şekil 4-18: Referans genin (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri

Şekil 4-19: Standart curve eğrisi

Şekil 4-20: OSCC ve OPML hastalarına ait tümör ve eşlenik normal doku ve sağlıklı dokuda *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında gözlenen metilasyon seviyeleri

Şekil 4-21: *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen OSCC hastalarının klinik parametrelerinin gösterimi

Şekil 4-22: *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen OPML hastalarının klinik parametrelerinin gösterimi

Şekil 4-23: *TBCD* geninin promoter bölgesinde CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen OPML hastalarına ait patolojinin gösterimi

Şekil 4-24: Malin grupta *TBCD* geninin ekspresyon ve promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin gösterimi

Şekil 4-25: Premalin grupta *TBCD* geninin ekspresyon ve promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin gösterimi

Şekil 4-26: OSCC ve OPML hasta grupları ve sağlıklı grubun metilasyon ve ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin gösterimi

Şekil 4-27: OSCC hasta grubunda *TBCD* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri ile differansiyasyon derecelerinin gösterimi

Şekil 4-28: Malin hasta grubunda lenf nodu tutulumuna göre *TBCD* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin gösterimi

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

WHO	:World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
IARC	:Uluslararası Kanser Ajansı
AJCC	:Amerikan Kanser Komitesi
OSCC	:Oral skuamöz hücreli karsinom (Oral Squamous Cell Carcinoma)
OPML	:Oral premalin lezyon
HNC	:Baş-Boyun Kanserleri (Head and Neck Cancer)
DNA	:Deoksiribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
cDNA	:Komplementer DNA (Complementary DNA)
BC-DNA	:Bisulfite Converted DNA (Bisülfite modifiye edilmiş DNA)
QMSP	:Kantitatif metilasyon spesifik PCR (Quantitative Methylation Specific PCR)
QRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR)
<i>TBCD</i>	: <i>Tubulin Folding Cofactor D</i> geni
<i>ACTB</i>	: <i>Beta Actin</i> geni
mRNA	:Mesajcı RNA
DNMT	:DNA metiltransferaz
FAM	:6-floroseinamidit
TAMRA	:Karboksitetrametilrodamin
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
LOH	: Heterozigotluk kaybı (Loss of heterozygosity)
HPV	:Human Papilloma Virus
EBV	:Epstein-Barr Virus
HIV	:Human Immunodeficiency Virus

ÖZET

BULUŞLU, B.B. (2020). Oral Kavitenin Malin ve Premalin Lezyonlarında *Tubulin Folding Cofactor D (TBCD)* Geninin Genetik ve Epigenetik Profilinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), oral kavite kanserlerinin en sık görülen türüdür. Yüksek morbidite ve mortalite oranları sebebiyle, OSCC gelişiminin altında yatan epigenetik/genetik mekanizmaları çözmek için moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Oral premalin lezyonlar (OPML) ise farklı oranlarda malin transformasyon riski olan neoplastik oluşumlardır. Demokan ve arkadaşlarının yaptığı TÜBİTAK-SBAG-114S497 no'lu çalışmada ekspresyon/metilasyon array verilerine göre OPML hastalarında *Tubulin Folding Cofactor D (TBCD)* geninin metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Çalışmamızda (IU-BAP-TYL-2019-35409) OSCC ve OPML'de *TBCD* geninin promoter bölgesindeki metilasyona bağlı ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki daha geniş hasta grubunda araştırılarak, *TBCD* geninin rolü araştırılmış ve kanserin erken tanısı için invaziv veya non-invaziv biyobelirteç olarak kullanılabilirliği test edilmiştir. Çalışmamızda 30 OSCC ve 30 OPML tanılı hastalara ait tümör-eşlenik normal doku ve vücut sıvıları (serum ve tükürük) ile kontrol grubu olarak 15 adet sağlıklı bireyin normal mukoza ve vücut sıvısı örneklerinde *TBCD* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyeleri belirlenmiş ve metilasyona bağlı ekspresyon kaybı incelenmiştir. OSCC hastalarının %66,6'sında (20/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya kıyasla ekspresyon seviyesinde azalma ve %20'sinde (6/30) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, 4 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmemiştir. OPML alt gruplarında LP tanılı hastaların %30,8'inde (4/13), OL tanılı hastaların %42,8'inde (3/7) ve OLD tanılı hastaların %50'sinde (5/10) ekspresyon seviyesinde azalma meydana gelmiştir. Genin promoter bölgesinde ise OSCC hastalarının %13,3'ünde (4/30) ve OPML hastalarının %10'unda (3/10) metilasyon saptanmıştır. OPML grubunda metilasyon saptanan hastaların %66,7'si (2/3) OLD tanılıdır. OSCC hastalarında metilasyon saptanan 4 hastanın 2'sinde (%50) ekspresyon seviyesinde azalma ve 1'inde ekspresyon seviyesinde artma (%25) gözlenirken; 1 hastada herhangi bir değişim gözlenmemiştir. OPML hastalarında ise metilasyon saptanan 3 hastanın 2'sinde (%66,7) ekspresyon seviyesinde azalma ve 1'inde (%33,3) ekspresyon seviyesinde artma gözlenmiştir. Tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastaların eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinde ve sağlıklı bireylerde metilasyon varlığı saptanmamıştır. OSCC ve OPML hastalarında ekspresyon seviyesindeki meydana gelen değişiklikler ile çeşitli klinik parametreler (sigara tüketimi, evre, anatomik tutulum, patolojik alt grup) değerlendirildiğinde anlamlılıklar görülmesine rağmen, düşük oranlarda gözlenen metilasyonun, değişen ekspresyon seviyeleri üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bu sebeple *TBCD* geninde tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre meydana gelen ekspresyonda azalmanın, OSCC ve OPML'de önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Promoter Metilasyon, Gen Ekspresyon, OSCC, OPML, *TBCD*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-35409.

ABSTRACT

BULUSLU, B.B. (2020). Investigation of Genetic and Epigenetic Profile of *Tubulin Folding Cofactor D (TBCD)* Gene in Malignant and Premalignant Lesions of the Oral Cavity. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Master Thesis. İstanbul.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common type of oral cavity cancers. Since it has high morbidity and mortality rates, molecular studies are needed to unravel epigenetic/genetic mechanisms underlying OSCC development. Precancerous lesions of the oral cavity (OPML) are diseases with different rates of malignant transformation risk. Demokan et al., showed that methylation-dependent-expression loss of *TBCD* gene in OPML patients via methylation/expression array results from their previous unpublished data (TUBITAK-SBAG-114S497). In our study (IU-BAP-TYL-2019-35409), the methylation and expression status of *TBCD* gene was investigated in a larger group of OSCC and OPML patients for further validation. The role of the *TBCD* gene as a differential diagnosis in the conversion of OPML to OSCC has been examined and its usability as an invasive or non-invasive methylation biomarker for early diagnosis of cancer has been tested. In our study, methylation and expression levels of *TBCD* gene were determined in tumor-matched normal tissue and body fluids (serum, saliva) of 30 OSCC and 30 OPML patients and normal mucosa and body fluid samples of 15 healthy individuals as a control group, and methylation-dependent-expression loss was examined in OSCC and OPML patient groups. The decreased expression levels of *TBCD* were observed in 60% (20/30) of tumor samples compared with matched-normal tissue, whereas the expression levels were increased in 20% (6/30) of OSCC patients. In OPML subgroups, expression level decreased in 30.8% (4/13) of patients with LP, 42.8% (3/7) of patients with OLD and 50% (5/10) of patients with OLD. We observed that the promoter region of the *TBCD* gene was methylated in 13,3% (4/30) of tumor tissues in OSCC patients and 10% (3/30) in OPML patients. Methylation was detected in 66.7% (2/3) of patients diagnosed with OLD. It was observed that in 2 of 4 (50%) OSCC patients who had methylation in the promoter region of the *TBCD* gene, a decrease occurred in the expression level due to methylation. While an increase in expression level occurred in 1 patient, no change was observed in 1 patient. It was observed that in 2 of 3 (%66,6) OPML patients who had methylation in the promoter region of the *TBCD* gene, a decrease occurred in the expression level due to methylation and an increase in the expression level in 1 patient were observed. There is no methylation was detected in matched-normal tissue, serum and saliva samples of patients with methylation in tumor tissue of both group. Although the changes the expression level and clinical parameters (smoking, stage, anatomic involvement, pathological subgroup) were found to be significant in OSCC and OPML patients, it was observed that methylation observed at low rates had no effect on expression levels. For this reason, it is thought that the decrease in the expression of *TBCD* gene in tumor samples compared with matched-normal samples may play an important role in OSCC and OPML.

Key Words: Promoter methylation, Gene expression, OSCC, OPML, *TBCD*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2019-35409.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

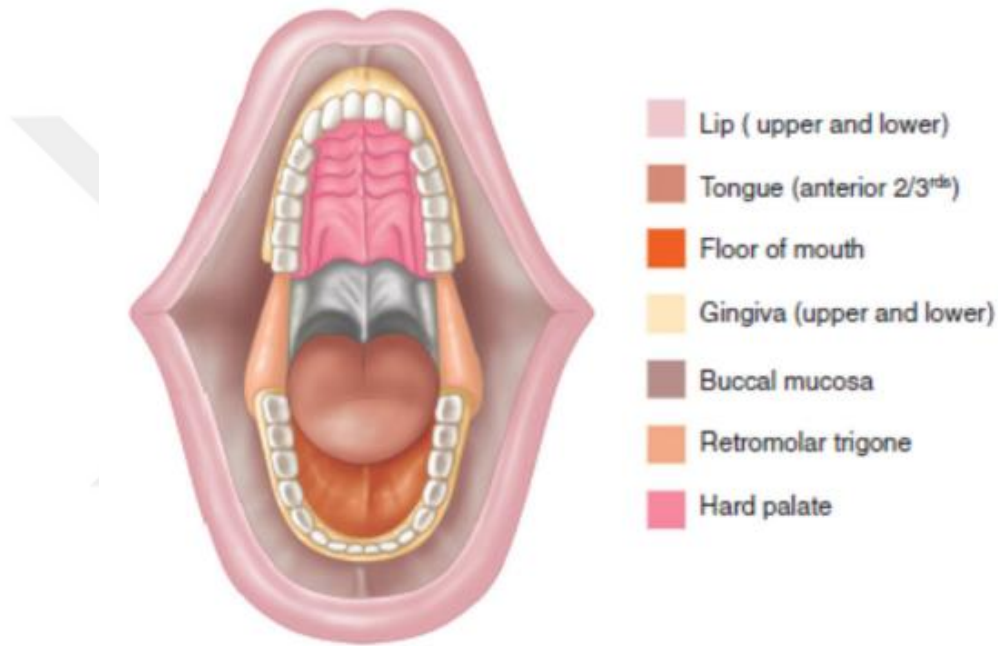
Kanser, gelişmiş ülkelerde ikinci ve gelişmekte olan ülkelerde üçüncü önde gelen ölüm nedenidir (Medicine et al., 2018). Kanser insidansının 2030 yılında, yılda 26 milyon vakaya ve 17 milyon ölüme yükseleceği tahmin edilmektedir (P. Boyle & Levin, 2014). Bu sebeple kanser önemli bir global sağlık sorunudur. Dudak ve oral kavite kanserleri, 2012 yılında dünya çapında toplam kanser vakalarının %2'si olmakla birlikte 145.000 kişinin ölümüne neden olmuştur. Dünyanın farklı bölgelerinde dudak ve oral kavite kanserleri farklı insidansa sahiptir. Batı Afrika, dudak ve oral kavite kanserleri için hem erkekler hem de kadınlar arasında en düşük insidansa (sırasıyla 100.000'de 1.7 ve 1.4) (Ferlay et al., 2015), Asya ise en yüksek insidansa sahiptir ve 2012 yılında Asya kıtasından 168.850 vaka bildirilmiştir (Saman Warnakulasuriya, 2009). Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), tüm oral kanserlerin yaklaşık %92-95'ini oluşturur (Medicine et al., 2018). OSCC oluşmadan önce çoğunlukla prekanseröz lezyon gözlenmektedir (Andre et al., 1995). Kanser transformasyonu riski yüksek olan oral mukozal bozukluklar, Dünya Sağlık Örgütü tarafından oral mukozanın potansiyel olarak malin bozuklukları (PMD) olarak adlandırılır (S. Warnakulasuriya et al., 2007). Oral premalin lezyonlar genel olarak eritroplaki, lökoplaki, kronik kandidiyazis, oral liken planus, oral submukoz fibrozis, diskoid lupus eritematozus, diskeratozis konjenita, aktinik keratoz, ters sigara içimine bağlı gelişen damak lezyonları ve dumansız tütün kullanımına bağlı gelişen keratoz olarak sınıflandırılmaktadır (S. Warnakulasuriya et al., 2007). Bu bozuklukların etiyojisi, genetik bozukluklar (Baldwin et al., 2005), tütün gibi eksojen faktörlerin neden olduğu bozukluklar ve nadir görülen kalıtsal hastalıklar ile ilişkili durumlardan da kaynaklanabilmektedir. Oral kanserlerin sıklığı giderek artmaktadır ve bu durumda birçok faktörün rol oynadığı görülmektedir. Sigara, alkol kullanımı, tütün çiğnenmesi, beslenme alışkanlıkları, genetik/viral etkenler gibi faktörlerin yanı sıra, oral mukozada meydana gelen morfolojik değişikliklerle birlikte klinik olarak gözle görülebilen premalign lezyonların oluşumunun hastalığın ortaya çıkmasında rol oynadığı bilinmektedir (Lodi et al., 2016). Epigenetik, nükleotid sekansında bir değişiklik içermeyen, aynı zamanda kalıtsal olabilen, gen ekspresyon seviyesindeki değişimleri inceleyen bilim dalıdır. Epigenetik mekanizmalar, doğrudan veya dolaylı olarak gen ifadesini kontrol eden mekanizmalardır ve geri dönüşümlüdür (Bird, 2007). DNA metilasyonu, genin promoter bölgesinde mevcut bulunan CpG adacıklarında

konumlanmış sitozin nükleotidinin, 5. karbonuna metil grubu eklenmesiyle meydana gelmektedir. Karsinogenez sürecinde en fazla gözlenen epigenetik değişiklik ise tümör supressör genlerin promoter bölgelerindeki DNA metilasyonu sonucu gen ifadesinin baskılanmasıdır. Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının yaptığı TÜBİTAK-SBAG-114S497 no’lu çalışmada OSCC ve OPML tanısında rol oynayan epigenetik temelli yeni aday biyobelirteç tespit edilmesi amaçlanmış ve ve bu hastalara ait tümör dokuları ile eşlenik normal doku materyalleri ile gerçekleştirilen ekspresyon ve metilasyon array verilerine göre Tubulin Folding Cofactor D (*TBCD*) geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon nedeniyle metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir. *TBCD* geni 17. kromozomun uzun (q) kolunun 25.3 bandına lokalize olup, 132600 Da’lık bir moleküler ağırlığa sahiptir ve 1192 aminoasitten oluşmaktadır. *TBCD*, tubulin ile etkileşime girerek mikrotubul dinamiklerini düzenleyen sentrozomal bir proteindir ve α ve β -tubulin heterodimerlerinin oluşumu için gerekli olan beş adet tubulin katlanan kofaktörden biridir. Tüm ökaryotik hücrelerde, *TBCD* varlığının hücre iskeletinin yeniden yapılandırılması için oldukça önemli olduğu gösterilmiştir (Flex et al., 2016). Tübülünün α ve β monomerleri, farklı genler tarafından kodlanan aminoasit dizilerinde farklılıklar gösteren izotipler olarak bulunmakta ve α/β heterodimerler, hücre bölünmesi ve büyümesi için gerekli olan mikrotübüllere polimerize olmaktadır. Tübülünün spesifik izotiplerinin ekspresyonunun ise kanser ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Binarová & Tuszyński, 2019). Bu nedenle çalışmamızda, *TBCD* geninin promoter bölgesindeki metilasyona bağlı ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki ile birlikte OPML ile OSCC’nin ayırıcı tanısında non-invaziv yöntemlerle potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ORAL KAVİTENİN ANATOMİK YAPISI

Oral kavite dil, dudak, ağız tabanı, bukkal mukoza, üst ve alt damak, sert damak ve retromolar trigon olmak üzere belli başlı anatomik alt bölgelere ayrılır. Yakınlıklarına rağmen, bu alt bölgeler onkolojik tedavinin planlanmasında dikkate alınması gereken farklı anatomik özelliklere sahiptir (Montero & Patel, 2015).



Şekil 2-1: Oral Kavitenin Anatomik Yapısı

Oral kavitede gözlenen skuamöz hücreli karsinom tipleri çeşitlilik göstermektedir. Sarkomatoid SCC genelde oral kavite ve larenks bölgesinde gözlenmektedir ve nüks riskinin oldukça yüksek olduğu bilinmektedir (Spector et al., 2011). Bazaloid karsinom kötü diferansiye oral kavite karsinomu ile benzerdir ve ortalama 5 yıllık sağkalım oranı mevcuttur. Verrüköz karsinom SCC'nin düşük dereceli varyantı olarak kabul edilmekte ve genellikle bukkal mukoza bölgesinde görülmektedir (De Sampaio Góes et al., 2004).

Dil tümörleri genelde epitelde ortaya çıkarak kaslara yayılım göstermektedir. Belirtiler arasında ağrılı ülserasyon düzensiz kitle yapısı mevcuttur. Sigara ve alkol

kullanımı bu tip kanserin ortaya çıkmasında oldukça etkili bir risk faktörüdür (Lydiatt et al., 1993).

Dudak tümörleri ise sıklıkla alt dudakta (%90) gözlemlenmekte olup, risk faktörleri arasında güneş ışığı, açık ten ve sigara kullanımı bulunmaktadır. Genellikle dudak tümörlerinde boyun metastazına rastlanmamakta ve hastalar çoğunlukla erken evrede tedavi edilmektedir (Zitsch et al., 1995).

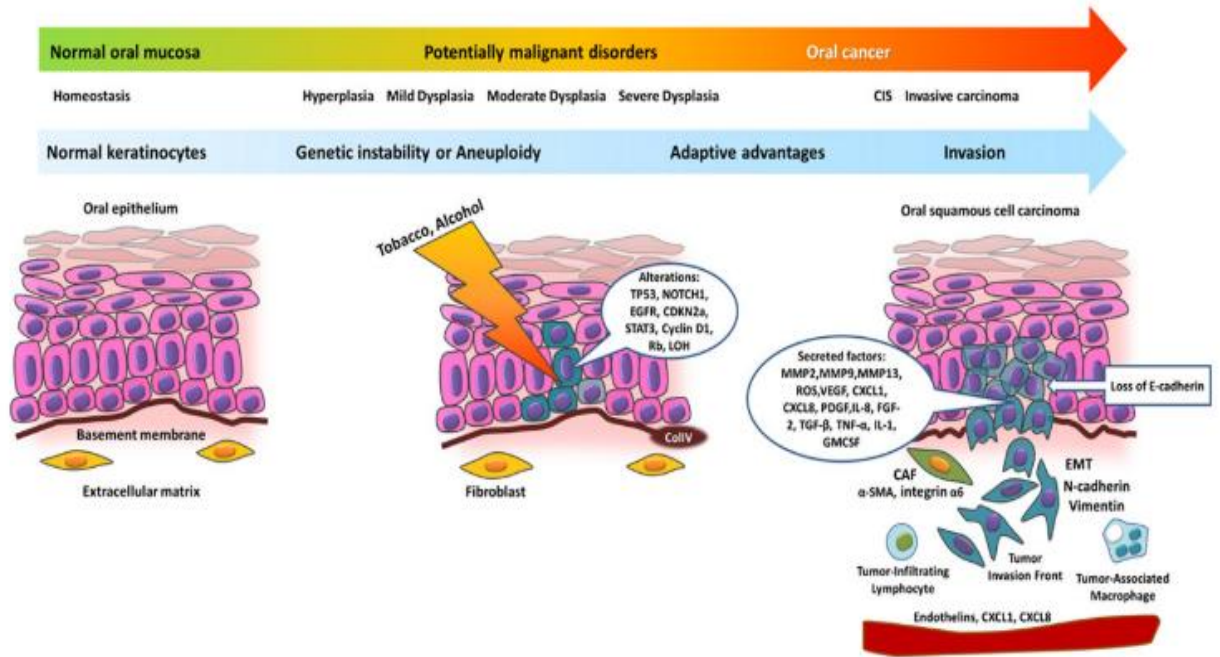
Ağız tabanı kanserlerinin yaklaşık %35'i ileri evrede saptanmaktadır (Shaha et al., 1984). 5 yıllık sağkalım oranı evre 1'de %90 civarı iken evre 4'te bu oran %35'e kadar azalmaktadır (Rodgers et al., 1993; Shack, 1986).

Retromolar trigon bölgesi tümörleri genelde ileri evrede teşhis edilebilen tümörlerdir ve buna bağlı olarak hastaların %50'sinde lenf nodu tutulumu görülmektedir. Evre 1'de 5 yıllık sağ kalım oranı %75 iken evre 4'te bu oran %20 olarak azalmaktadır (Huang et al., 2001).

Bukkal mukoza bölgesinde görülen tümörler tüm oral kavite kanserlerinin %10'unu oluşturmaktadır ve en önemli risk faktörü tütün kullanımıdır. 5 yıllık sağkalım oranı evre 1'de yaklaşık %75 iken evre 4'te bu oran %20'ye kadar düşebilmektedir (Jing et al., 2006).

2.2. ORAL KAVİTEDE PREMALİN DEĞİŞİKLİKLER VE DİSPLAZİ KAVRAMI

Günümüzde oral bölgede gerçekleşen epitelyal değişikliklerin tanımlanması için "Oral epitelyal displazi (OED)" terimi kullanılmaktadır ve ağız boşluğunun lezyonları için de bu terim tercih edilmektedir (S. Warnakulasuriya et al., 2007). OSCC oluşumuna kadar geçen sürede çeşitli sebeplerle hücrelerde homeostazi bozulmakta ve hücrede epitelyal hiperplazi, farklı derecelerde displazi, in situ karsinom ve bunun sonucu olarak invaziv karsinom ortaya çıkmaktadır. Bu aşamada ilk tespit edilebilir klinik değişiklik, potansiyel olarak yaygın olan lökoplaki gibi çeşitli malin bozuklukların ortaya çıkmasıdır. Bu bölge mikroskopik olarak hiperplazi ve hiperkeratoz gibi çeşitli reaktif epitelyal değişiklikler göstermektedir. Histolojik olarak displastik ve displastik olmayan lökoplaki arasında bir ayırım yapılması oldukça önemlidir (Rivera, 2015).



Şekil 2-2: Oral kavite karsinogenezinde çok aşamalı progresyon

Hafif dereceli displazide hücresel/yapısal değişiklikler minimaldir ve lezyon epitel tabakanın 1/3'lük kısmı ile sınırlı bulunmaktadır. Orta dereceli displazide hücresel/yapısal değişiklikler artmıştır ve lezyon epitelin tam kalınlığının 2/3'ünde görülmektedir. İleri derece displazide hücrede belirgin değişiklikler gözlenmekte ve bozulmalar meydana gelmektedir. Karsinoma in situ ise ileri derece displazinin en yoğun versiyonu olarak kabul edilmekte, hücresel/yapısal değişiklikler tüm epitelde görülmekte ve bu duruma ek olarak anormal mitoz gözlenmektedir (Speight & Eng, 2018). Bu nedenle OED derecesi malign transformasyon için en önemli prognostik faktördür (Reibel, 2003).

2.3. ORAL KAVİTENİN PREMALİN LEZYONLARI

1973 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), oral premalin lezyonları, “oral kanserin, görünüşte normal eşleniğine göre daha olası olduğu morfolojik olarak değiştirilmiş doku” olarak tanımlamıştır (Geneva: World Health Organization, 1973); son yıllarda ise araştırmacılar, ‘potansiyel malin bozukluk’ teriminin kullanılmasını önermişlerdir (S. Warnakulasuriya et al., 2007).

Çalışmamıza premalin lezyonlardan, literatürde maliniteye dönüşme riski yüksek olduğu bildirilen oral lökoplaki (OL) ile malinite potansiyeli düşük olan oral

likan planus (OLP) ve oral likenoid displazi (OLD) dahil edilmiştir. WHO tanımlarına göre OL, oral mukozada predominant beyaz lezyon olarak tanımlanıp başka klinik veya histopatolojik tanımlaması olmayan lezyon grubudur. OL, lokalizasyona bağlı olarak vakaların %5-15’inde OSCC dönüşüm riski göstermesi açısından klinik olarak önemlidir (Izumo, 2011). OLP, mukokütanöz kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Danielsson et al., 2012) ve %0,4-%5,6 OSCC dönüşüm riski bulunmaktadır (van der Meij et al., 2007). OLD, klinik ve histolojik olarak LP’yi taklit ettiği için, tanı sırasında sıklıkla karıştırılmaktadır. Ancak OLD’de, likenoid özelliklere ilaveten histopatolojide displazi de gözlenmektedir (S.K.S. et al., 2011).

Oral premalin lezyonlar düşük ve yüksek dereceli olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Düşük dereceli lezyonlar, hiperkeratoz, liken/likenoid lezyon ve hafif dereceli displazi; yüksek dereceli lezyonlar ise orta dereceli displazi, yüksek dereceli displazi ve eritroplaki olarak 3 gruba ayrılmaktadır.

Eritroplaki “klinik veya patolojik olarak tanımlanabilir başka herhangi bir hastalık olarak karakterize edilemeyen, parlak kırmızı renkli bir plak veya yama şeklinde lezyonlar” olarak tanımlanmaktadır (Axell et al., 1984). Eritroplakinin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve predispozan faktörler halen tam olarak bilinmemektedir ancak tütün ve alkol kullanımının çoğu vakada yer aldığı bildirilmiştir (Crispian Scully, 2013). Eritroplaki en sık 50-70 yaş arası erkeklerde görülmektedir (Bouquot & Gorlin, 1986). Özellikle en sık eritroplaki gözlenen bölgeler yumuşak damak, ağız tabanı ve bukkal mukozadır (Crispian Scully, 2013).

Eritroplaki lezyonlarında % 40 oranında karsinoma in situ ve % 9 oranında hafif ila orta derecede displazi görülür (Shafer & Waldron, 1975). Eritroplaki malign dönüşüm oranları oldukça yüksektir ve %14 ila %50 arasında değişmektedir (Reichart & Philipsen, 2005). Bu yüksek oran sebebi ile hastalığın erken teşhisi oldukça önemlidir ve bunu takiben acil cerrahi eksizyon önerilmektedir.

Klinik olarak oral mukozada görülen, diğer bozukluklar ile açıklanamayan ve silindiğinde uzaklaşmayan beyaz leke ve lezyonlara oral lökoplaki ön tanısı koyulmaktadır (S. Warnakulasuriya et al., 2007). Klinik tabloya bağlı olarak lökoplaki homojen ve homojen olmayan form olmak üzere 2 forma ayrılmaktadır.

Homojen form, epitelde kısa çıkıntılara sahip düzgün kenarlı beyaz bir lezyon ile lezyon boyunca tek tip bir reaksiyon modeli gösterir.

Homojen olmayan form ise üç tiptir:

- i) Yüzeyden bakıldığında karışık olarak beyaz ve kırmızı görünümde, ancak ağırlıklı olarak beyaz
- ii) yuvarlak kırmızı veya beyaz çıkıntılar olan küçük polipoid çıkıntıları olan nodüller
- iii) buruşuk veya oluklu yüzey görünümü olan verrüköz yapı (Saman Warnakulasuriya & Dsc, 2018).

Oral lökoplakiler genellikle 40 yaşından sonra teşhis edilmektedir ve tanı alanların %1'inden azı 30 yaşın altındaki erkeklerdir (Bouquot & Gorlin, 1986). Lökoplaki global prevalansının % 2.60 olduğu tahmin edilmektedir (Petti, 2003). Erkeklerde ve sigara içenler arasında sigara içmeyenlere göre altı kat daha yaygındır (Vázquez-Álvarez et al., 2010). Lökoplaki, tütün ve alkol kullanımı hariç olmak üzere herhangi bir kimyasal veya fiziksel ajan ile ilişkili değildir (Axéll et al., 1996) ancak lökoplakilerin bir kısmında insan papilloma virüsünün (HPV) potansiyel bir role sahip olabileceği gözlemlenmiştir (Saman Warnakulasuriya & Dsc, 2018). Lökoplakiler yaygın olarak dilin yan kenarı ve ağız tabanında gözlenmektedir. Bununla birlikte, Asya kıtasında bazı bölgelerde betel quid adı verilen maddenin çiğnenmesi ve ağız boşluğunda tutulması nedeniyle bukkal mukoza ve düşük bukkal oluklar yaygın olarak etkilenmektedir (Nagao et al., 2016). Genellikle çoğu lökoplaki asemptomatiktir ve rutin bir görsel muayene sırasında gözlenmektedir (Dilhari et al., 2016). Lökoplaki geçici bir klinik tanı olduğu için gözlenen beyaz lezyon vakit kaybetmeden biyopsi yapılarak patolojik olarak incelenmelidir. Biyopsi yapma nedenleri, beyaz lezyondan sorumlu olabilecek herhangi diğer patolojileri (karsinom dahil) dışlamak ve lezyon içerisindeki epitel displazisinin varlığını ve derecesini değerlendirmektir (Boy, 2012).

Oral liken planus (OLP), oral mukozada meydana gelen, kronik ve inflamatuvar otoimmün bir hastalıktır. OLP, atrofik mukozadaki asemptomatik retiküler beyaz lezyonlardan erozif ülseratif alanlara kadar uzanırken, en karakteristik özelliği dantel benzeri ince beyaz çizgiler ağının varlığıdır. Liken planus çoğunlukla orta yaşlarda (40 yaş üstü) gözlenmekte ve kadınlar hastaların %65'ini oluşturmaktadır (Reichart & Philipsen, 2005). OLP'nin dünya çapındaki yaygınlık oranları ise %0.5 ila %2.6 arasında değişmektedir (D. & N., 2010). Liken planusun oral belirtileri kişiler arasında farklılık göstermektedir. Ağız içindeki mukozal lezyonlar genellikle fazla sayıda ve

simetrik bir dağılıma sahiptir (Al-Hashimi et al., 2007). Liken planus lezyonları yaygın olarak bukkal mukozada ve dilin lateral kenarlarında iki taraflı keratotik dantel benzeri bir ağ olarak bulunur. OLP klinik görünüş olarak doğrusal, retiküler, halka şeklinde, papiller, plak, atrofik ve ülseratif olmak üzere belli başlı alt tiplere ayrılabilir (Saman Warnakulasuriya & Dsc, 2018). Retiküler tip klinik uygulamada en sık rastlanan tiptir ve hastaların çoğu asemptomatiktir. Bu lezyonlar, kesik çizgiler şeklinde görülmektedir. Retiküler OLP sıklıkla mukoza kıvrımı, diş eti, labial mukoza, ağız tabanı, dudaklarda ve nadiren damakta bulunur. Papüler tip, dil sırtında yaygın olarak gözlenen bir plak tipi olan lökoplakiye çok benzemekle birlikte, lezyon çevresinde keratotik beyaz strialar bulundurmaktadır. Atrofik eroziv ve ülseratif tipler ise açık ülserasyonla ortaya çıkabilmektedir. Genellikle kenarlarda keratotik beyaz strialar görülmektedir ve semptomlarda hastalar sıcak veya baharatlı yiyecekler yerken ağrı veya yanma hissinden şikayet etmektedirler (Saman Warnakulasuriya & Dsc, 2018). Bazı raporlar OLP'nin, herpes simplex, Epstein-Barr virüsü, hepatit C ve insan papilloma virüsü gibi viral enfeksiyonlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Farthing et al., 1990). OLP'de malign dönüşüm riski ise uzun süredir tartışmalıdır ve %0,4 ile %3,7 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Abbate et al., 2006). Hastalık alevlenme ve gerileme dönemleri sebebiyle yıllarca sürebilmektedir (Fitzpatrick et al., 2014). Günümüzde OLP'nin kesin bir tedavisi bulunmamaktadır. Hastalığın tedavisinde hastada gözlenen ve hastanın yaşam kalitesini düşüren semptomların şiddeti ve süresinin azaltılması hedeflenmektedir. OLP tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar hastalığın şiddetine göre değişmekte olup, topikal ve sistemik kortikosteroidlerdir. Ancak semptomatik atrofik, ülseratif lezyonların görüldüğü OLP'li hastalar için halen yeni ve etkili tedavi yöntemleri araştırılmaktadır (Dietrich et al., 2004).

Kandidal lökoplaki (CL), yanaklarda, damakta, dudaklarda ve dilde sert ve beyaz deri plakları ile karakterize kronik formdur (Mortazavi et al., 2014). Hastalığın en büyük etiyolojik ajanı, ağırlıklı olarak *Candida albicans*'a ait olan oral mantar patojeni *Candida*'dır ancak vitamin eksikliği gibi sistemik faktörler katkıda bulunan bir rol oynayabilir. Lezyonlar klinik olarak semptomsuzdur, uygun antifungal tedaviden ve beslenme eksikliklerinin düzeltilmesinden sonra gerilemektedir. Lezyonlar tedavi edilmezse, küçük bir kısmı displazi gösterebilir ve karsinomlara dönüşebilir (Sitheeque & Samaranayake, 2003).

Oral submukoz fibrozis (OSF), oral mukozanın lamina proprealarını, farenks veya özofagusun herhangi bir bölümünü etkileyebilen sinisi ve kronik bir hastalıktır (Saman Warnakulasuriya & Dsc, 2018). Hastalığın ilerlemesi ile birlikte, ağız boşluğunun derin submukozasındaki dokulara infiltrate olarak fibroelastisite kaybına sebebiyet vermektedir (Medicine et al., 2018). Bu kayba bağlı olarak değişen yoğunluğa sahip mukozal bir sertlik meydana gelmekte ve bu durum hastada ağzı açmada aşamalı bir yetersizliğe ve dilde sertliğe neden olmaktadır (Shafer & Waldron, 1975).

Erken evre özellikleri arasında mukozanın beyazlaması, pigmentasyon kaybı ve baharatlı yiyeceklere karşı meydana gelen yanma hissi bulunur (R.Bte. et al., 1999). Klinik muayenede ise, batık yanaklar, ağız hareketlerinin kısıtlanması ve belirgin bir papilla kaybı gözlenmektedir. OSF belirtilerinin ve meydana gelen semptomlarının şiddeti ve sıklığı oldukça değişkendir. Hastalığın şiddeti genellikle ağız açıklığının değerlendirilmesi ile orantılı olarak ölçülür (S. Warnakulasuriya, 1987).

OSF, Hint popülasyonunda 20-40 yaş arasındaki erişkinlerde yaygındır ve biber tüketimi, beslenme eksikliği, areca nut vb. tütün çiğnemesi, genetik duyarlılık, otoimmünite ve kollajen bozuklukları gibi etkenlerin bu durumun patogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Murti et al., 1995).

OSF'nin malign transformasyon riski %2- %8 arasında değişmekte olup (Ray et al., 2016) OSF'ye sahip hastalarda OSCC gelişme olasılığı sağlıklı insanlara göre en az 19 kat daha fazladır (Reichart & Philipsen, 2005). OSF kaynaklı OSSC ortalama 46 yaşında görülmekte ve erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmektedir, aynı zamanda daha invazivdir ve diğer lezyonlardan kaynaklanan OSSC'den daha fazla metastaz riski bulunmaktadır (F. Guo et al., 2011).

Diskoid lupus eritematozus, sistemik, ilaca bağlı ve diskoid olmak üzere üç forma sahip kronik, otoimmün hastalıktır. Yaygın olarak cildi, dudakların mukozal yüzeyini ve ağız boşluğunu etkilemektedir. Sistemik lupuslu hastaların yaklaşık %20'si oral lezyonlar yolu ile kendini gösterebilmektedir. Hastalık, etkilenen bölgelerdeki bir bağışıklık kompleksi birikimi ile tetiklenerek vaskülitte yol açar (Saman Warnakulasuriya & Dsc, 2018).

DLE prevalansı %0.5'ten düşüktür ve kadınlarda erkeklere oranla daha yaygındır (Jemec et al., 2009). DLE, Dünya Sağlık Örgütü İşbirliği Merkezi tarafından potansiyel malign bir hastalık olarak kabul edilmiştir, ancak malign dönüşümün çok

nadir olduğu bilinmektedir (S. Warnakulasuriya et al., 2007). Malign dönüşüm nadir olsa da, epitel displazisi ve UV ışığına uzun süre maruz kalma, malin dönüşüm ile ilişkili risk faktörleri arasındadır (Reibel, 2003).

DLE'nin histopatolojik özellikleri arasında ise hiperkeratoz yapı, yüzeysel ve derin enflamatuvar infiltrasyon ve lamina propreada meydana gelen ödem yer almaktadır (Lourenço et al., 2006)

Cole-Engman sendromu veya Zinsser-Cole-Engman sendromu olarak da adlandırılan diskeratoz konjenita (DC), tırnak distrofisi, retiküler cilt pigmentasyonu ve oral lökoplaki üçlüsü ile karakterize olan ve nadir görülen kalıtsal bir hastalıktır (Auluck, 2007).

Esas olarak erkekleri etkileyen, 5 ila 13 yaş aralığında gözlenen ve Xq28 bölgesinde bulunan Diskerin Psödouridin Sentaz 1 (DKC1) geninin mutasyonundan kaynaklanan DC (Kirwan & Dokal, 2008), oldukça nadir görülmekte olup 1/1.000.000 oranında gözlenmektedir. (C. Scully et al., 2012). DC, malign dönüşüm riskini önemli ölçüde artırmaktadır (Bongiorno et al., 2017). Hastaların çoğunda yaklaşık %87 oranında lökoplaki gelişmekte olup hipodonti, hipokalsifikasyon, diş eti çekilmesi, kanaması ve iltihabı, alveolar kemik kaybı, geniş çürükler, atrofik dil mukozası gibi ağız ve diş anormallikleri ortaya çıkmaktadır (Baran et al., 2010).

Hastalığın etkin bir tedavisi henüz bulunamamış olup, bleomisin, steroidler, A vitamini ve cerrahi gibi tedavi seçenekleri değerlendirilmektedir (Auluck, 2007).

Aktinik keratoz (AC), ultraviyole ışınlarına fazla maruz kalmaktan kaynaklanan ve bölgesel olarak çoğunlukla alt dudağı etkileyen kronik bir inflamatuvardır. Açık ten AC için önemli bir risk faktörüdür ve erkekler kadınlara oranla hastalığa daha yatkındır (Wood et al., 2011). Aynı zamanda AC gelişimi hastanın güneşe maruz kaldığı süre, yaş, genetik yatkınlık, coğrafi konum ve meslek ile ilişkilidir (Jadotte & Schwartz, 2012).

AC çok çeşitli klinik özelliklere sahip olmakla birlikte yaygın klinik tablo kabuklanma, pullanma, ve beyaz lezyonlardan oluşan benekli bir görünümdür (de Oliveira Ribeiro et al., 2014). Hastalığın progresyonu sırasında iltihaplanma, atrofi ve epitel kaybı ile ülseratif lezyonlar gelişmekte ve hastanın yaşam kalitesi düşmektedir.

AC, malign transformasyon riski yüksek olan bir lezyondur. Dudağın aktinik keratozu, erkek popülasyonda sık görülen 10. kanser olan dudak kanserinin başlıca nedenlerinden biridir. Meydana gelen vakaların %6 ila %10'u zamanla malign transformasyona uğramaktadır (Mortazavi et al., 2014).

Kriyoterapi, elektrocerrahi, 5-flurouracil krem, fotodinamik tedavi ve vermilyonektomi dahil olmak üzere aktinik keratoz tedavisi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır (Wood et al., 2011).

Dumansız tütün keratozu, tütünün ağız içinde tutulduğu bukkal veya labial girişte beyaz bir plak ile karakterizedir. Mukozal farklılaşma derecesi tütünün kalitesine ve kullanım sıklığına bağlıdır ve gelişimi yaklaşık olarak 5 yıl sürer. Ürünün yakılmadan kullanıldığı tütün ürünleri dumansız tütün olarak adlandırılır. Bu ürünlerin 30'dan fazla karsinojen içerdiği bilinmektedir (Khan et al., 2016). Bu lezyonda epitelyal displazi saptanmıştır ve dumansız tütün kullananlarda OSCC gelişme riski kullanmayanlara göre dört kat daha fazladır. 6 haftadan uzun süreli lezyonlar gerçek lökoplaki veya karsinom olarak düşünülmeli ve biyopsisi yapılmalıdır (Mortazavi et al., 2014).

2.4. ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM (OSCC)

2.4.1. Epidemiyoloji

Oral kanserler, dudak veya ağız boşluğuna bağlı malin bir neoplazidir. Geleneksel olarak oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) olarak tanımlanmakta olmalarının sebebi bu bölgedeki kanserlerin %90'ının histolojik olarak skuamöz hücrelerden köken almasıdır (Lingen et al., 2008). OSCC'lerin farklı düzeylerde diferansiyasyon ve lenf nodu metastazı eğilimi bulunmaktadır. (Barnes et al., 2005).

21. yüzyılda özellikle genç hastalarda artan insidans ve her yıl 300.000'den fazla yeni vakanın görülmesi nedeniyle OSCC, ölümcül ve küresel önemi gittikçe artan bir hastalık olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre hastalık insidansının en yoğun olduğu bölgeler Güney-Doğu Asya (Sri Lanka, Hindistan, Pakistan ve Tayvan), Batı (Fransa) ve Doğu Avrupa (Macaristan, Slovakya ve Slovenya), Latin Amerika ve Karayipler (Brezilya, Uruguay ve Porto Riko) ve Pasifik bölgeleridir (Papua Yeni Gine ve Melanezya) (Saman Warnakulasuriya, 2009).

OSCC erkeklerde kadınlara göre iki ila üç kat daha yaygındır (Rivera, 2015). Tanı ve tedavide meydana gelen önemli gelişmelere rağmen, OSCC hastalarının %50'sinde sağkalım halen 5 yıl civarında seyretmektedir (P. Thomson, 2013).

2.4.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

OSCC'de sigara ve alkol tüketimi temel etyolojik faktörler olmakla birlikte (Blot, 1992), beslenme yetersizliği, genetik yatkınlık, immün sistem bozuklukları, virüs kaynaklı etkenler, ağız hijyeninin yetersizliği, radyasyon ve kronik enfeksiyonlar da risk faktörleri arasında yer almaktadır. Ek olarak özellikle Asya popülasyonunda betel nut ve tütün çiğneme gibi diğer alışkanlıklar da söz konusudur (Montero & Patel, 2015). Buna bağlı olarak Asya toplumlarında oral kavite kanserlerinin insidansı fazladır.

Tütün özellikle polisiklik hidrokarbonlar ve nitrozaminler başta olmak üzere birçok karsinojen içermektedir (Spitz et al., 1988). OSCC geliştirme riskinin sigara içenlerde içmeyenlere göre 3 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Gandini et al., 2008). Bu risk tütünün bırakılmasından sonra azalsa da tamamen yok olmamaktadır (Macfarlane et al., 1995). Yalnızca sigara içimi değil, sigara içilen ortamda bulunmak da OSCC riskini sigara içmeyen ve maruz kalmayanlara göre %87 oranında arttırmaktadır (Y. C. A. Lee et al., 2009). Sigara dumanı, diş eti iltihabı, periodontit ve oral kansere teşvik ederek ağız boşluğundaki bağışıklığı zayıflatır (J. Lee et al., 2012). Bu duman kanserin başlangıcını destekleyen, nitrozaminler, benzopirenler ve aromatik aminler olarak adlandırılan 3 temel grup içerir. Bu kimyasallar pre-karsinojenler olarak adlandırılır ve bu karsinojenlerin sebep olduğu hasar sayesinde DNA'da mutasyon geçirmiş bölgeler oluşur. Bu duruma ek olarak enzimatik ve enzimatik olmayan metabolizma, serbest radikaller gibi son derece reaktif karsinojenler de üretmektedir (Rivera, 2015). Bu serbest radikallerin yüksek seviyeleri oral prekanser ve OSCC'de gözlenmektedir (Choudhari et al., 2014).

Alkol tüketimi, oral mukoza geçirgenliğinin artırılmasına, epitelyumun lipid bileşenlerinin çözülmesine, epitel atrofisine ve DNA sentez ve onarımında hasarlara neden olduğundan, OSCC'de lokal ve sistemik olarak gözlenen önemli bir risk faktörüdür. Tüm bunlara ek olarak alkol tüketiminin tükürük akışının azalmasına neden olan genotoksiste ve mutajenik etkileri de mevcuttur ve karaciğerin toksik veya potansiyel olarak karsinojenik ajanlarla başa çıkma yeteneğini etkilemektedir (Reidy et al., 2011). Alkol ve tütünün birlikte kullanılmasının oral ve orofaringeal SCC

etiolojisinde sinerjistik bir etkisi olduğu bilinmektedir (Brugere et al., 1986). Bununla birlikte, alkol sigara kullanıcısı olmayanlarda dahi artan kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (Kato & Nomura, 1994).

OSCC’de bir diğer önemli risk faktörü ise UV radyasyonu ve esas olarak orofarenks karsinomu ile ilişkili olan Human Papilloma Virüsü’dür (HPV) (Dalianis, 2014). Ultraviyole radyasyon, özellikle UVB, dudak kanserinde önemli rol oynamaktadır. IARC, Human Papilloma Virus 16’yı (HPV-16) oral kavite ve orofarenks kanserleri ile ilişkilendirirken, HPV-18’i oral kanser ile ilişkilendirmiştir (Rivera, 2015). HPV ile ilişkili baş-boyun skuamöz hücreli karsinomun (HNSCC) en yaygın gözlendiği bölgeler, %75 prevalans oranı ile orofarenkste yer alan tonsiller ve dil tabanıdır. Aynı zamanda HPV’nin varlığı, lokal olarak ilerleyen orofarenks kanserlerinde olumlu sonuç elde etmek için önemli bir prognostik biyobelirteçtir (Kang et al., 2015).

İmmün sistemin baskılanması da OSCC’de önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalarda Human Immunodeficiency Virus (HIV)’in OSCC’yi iki kat daha fazla etkilediği belirtilmiştir. Ayrıca Epstein Barr Virus (EBV), sitomegalovirüs ve Human Herpesvirus 8 (HHV-8)’de OSCC’de risk faktörleri arasında bulunmaktadır (Meurman, 2010).

OSCC’yi etkileyen bir diğer etken Candida albicans adı verilen mantar enfeksiyonlarıdır. Bu mantar enfeksiyonları OPML patogeneğinde özellikle rol oynamaktadır. Candida albicans suşları genellikle flukonazol gibi yaygın olarak kullanılan antifungal ajanlara karşı oldukça dirençlidir (Dahiya et al., 2003). Oral kanser hastalarında bu suşların bulunduğu tespit edilmiştir ve Candida karsinom lezyonlarında sağlıklı ağız mukozasına göre daha yaygındır (Nagy et al., 1998).

Meyve sebze tüketiminin genel olarak tüm kanserlerde riski azalttığı bilinmektedir ve bu konuda yapılan geniş epidemiyolojik çalışmalar mevcuttur (Palacios et al., 2009). Özellikle Akdeniz diyeti olarak adlandırılan diyetin, kanser riskini büyük ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Bosetti et al., 2003). Oral kanserin gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda eser elementler, vitaminler, yağ asitleri ve beta-karoten gibi diyet bileşenleri incelenmiş (Kune et al., 1993) ve demir ve folik asit eksikliklerinin oral kanser riskini arttırdığı öne sürülmüştür (Chimenos Küstner et al., 2003). Ancak bunun kesinleşmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.

Kötü ağız hijyeni, düzensiz diş fırçalama ve kronik irritasyonların diğer risk faktörleri ile birleşerek OSCC gelişiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak bu durumların bağımsız olarak değerlendirilmeleri zordur. Örneğin kaybedilen diş sayısı oral kanser ile ilişkilendirilmiştir ancak ağız sağlığı ile ilgili değişkenler de tütün ve alkol kullanımı ile bağlantılıdır (Hooper et al., 2009). Bu nedenle bu risk faktörlerinin OSCC gelişimini tek başına etkileyip etkilemediği halen tartışmalıdır.

2.4.3. Histopatoloji

OSCC, oral mukozanın skuamöz çok katlı epitelinden meydana gelen malin bir kanser türüdür ve en sık görülen tipi skuamöz (yassı epitel) hücreli karsinomdur (%90). Dilin ventral yüzeyi ve ağız tabanı keratinize olmayan mukozayla örtülüdür, bu nedenle OSCC'den en çok etkilenen bölgelerdir (Neville & Day, 2002). Normal tabakalı skuamöz oral mukozanın premalign ve daha sonra malign dokuya dönüşümü tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu durumun birikmiş genetik hasarların, onkogenlerin ve tümör supressör genlerin normal işleyişi bozduğu, karmaşık, çok aşamalı ve multifaktöriyel bir süreç olduğu kabul edilmektedir (P. J. Thomson, 2018).

OSCC geleneksel olarak az, orta ve iyi diferansiye şeklinde derecelendirilmektedir (Pindborg et al., 1997). Tümörün kaynaklandığı dokuya benzemesi o tümörün iyi diferansiye olduğunu göstermektedir. Dokuya benzerlik derecesi azaldıkça diferansiyasyon da azalmakta ve tümörü tanımlamak zorlaşmaktadır (Haksever, 2013).

OSCC'nin en sık görülen alt tipleri bazaloid skuamöz hücreli karsinom ve verrüköz karsinomdur. Bazaloid karsinom SCC'nin yüksek dereceli varyantı olarak görülmekte ve 5 yıllık sağkalım oranları orta ve az diferansiye OSCC'ler ile benzerdir (Wain et al., 1986).

Verrüköz karsinom ise SCC'nin düşük dereceli varyantı olarak kabul edilmekte olup bölgesel olarak bukkal mukozada gözlennmektedir. Rejyonel yayılım ihtimali oldukça düşüktür ve radyoterapiye dirençli olduğundan tedavisi cerrahidir.

2.4.4. Evreleme ve Prognoz

OSCC, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından, lenf nodu metastazı, tümör büyüklüğü ve metastaz varlığı da göz önüne alınarak belirlenen TNM evreleme kriterlerine göre sınıflandırılmaktadır.

T: Primer lezyonu ifade etmekte ve tümör boyutu ile çevre dokulara infiltrasyon derecesi baz alınarak değerlendirilmektedir.

N: Bölgesel lenf nodu tutulumunu ifade etmektedir.

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

M: Uzak metastaz varlığını ifade etmektedir.

Tablo 2-1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, oral kavite tümörleri TNM evrelemesi

Proгноza etki eden faktörler tümör boyutu, tümörün diferansiyasyon derecesi ve uzak metastaz varlığıdır. OSCC’de iyi diferansiye tümörler ve metastaz yokluğu prognozu iyi yönde etkilemektedir (Lo et al., 2003).

OSCC invazyon derinliği ile 5 yıllık sağkalım ilişkisi ve bölgesel lenf nodu metastazı ilişkisi incelendiğinde, 2 mm’den az invazyon derinliği olan lezyonlar için, hastaların %13’ünde bölgesel lenf nodu metastazı gösterilmiş olup 5 yıllık sağkalım %95 oranında gözlenmiştir. 2 ila 9 mm invazyon derinliği olan lezyonlar içi ise, hastaların %46’sında bölgesel lenf nodu metastazı görülürken 5 yıllık sağkalım oranı %85 olarak bulunmuş ve invazyon derinliği 9 mm’yi geçen lezyonlarda ise bölgesel lenf nodu metastazı %65 olarak izlenirken 5 yıllık sağ kalım %65 olarak görülmüştür (Shaha et al., 1984).

2.4.5. Tanı ve Tedavi

Oral kavitenin en önemli fonksiyonları çiğneme ve konuşmanın gerçekleştirilmesidir. Bu nedenle tedavi rejimi, birçok faktör göz önüne alınarak, hastanın ihtiyaçlarına göre ve hastaya iyi yaşam kalitesi ile birlikte uzun süreli sağkalım için bireysel olarak belirlenmelidir (Omura, 2014).

Erken tanı OSCC’de prognozu etkileyen faktörlerin başında gelmektedir ve sağkalımı önemli ölçüde arttırmaktadır ancak hastalık başlarda semptomsuz olarak ilerlediğinden erken tanısı oldukça zordur. Hastada gözlenen lezyonlar izlenmeli ve gerektiği takdirde biyopsi alınmalıdır.

Oral kavite kanserlerinde birincil tedavi yöntemi, hastalığın evresine göre belirlenmekte ve temeli cerrahi tedavi oluşturmaktadır. Bu nedenle fiziksel muayene ve görüntülemenin bulgularına göre doğru evreleme oldukça önemlidir. Teknolojideki son gelişmeler bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ultrasonografi ve pozitron emisyon tomografisi (PET) -CT gibi çeşitli görüntüleme yöntemleri sağlamıştır. BT ve MRI’nin öncelikli önerilmesinin sebebi lejyonel hastalığın değerlendirmesidir (McGuirt, 1982). Ayrıca, oral kanser hastalarının %7’sinin üst sindirim sisteminde eş zamanlı olarak primer bir lezyon gözleendiğinden,

hastalığın evrelendirilmesinde bu bölgenin endoskopik muayenesi de önerilmektedir (Vyas & Desai, 1981).

Radyoterapi ise sıklıkla cerrahi ve/veya kemoterapiyle birlikte veya tek başına kullanılmakta ve genelde ameliyat sonrası ışınlanmış dokuyu cerrahi olarak çıkarmak zor olduğundan uygulanmaktadır. Büyük primer tümörler, pozitif veya yakın cerrahi sınırlar, lenf veya vasküler invazyon gibi faktörler genellikle primer bölgede radyoterapi kullanımını belirler (Omura, 2014).

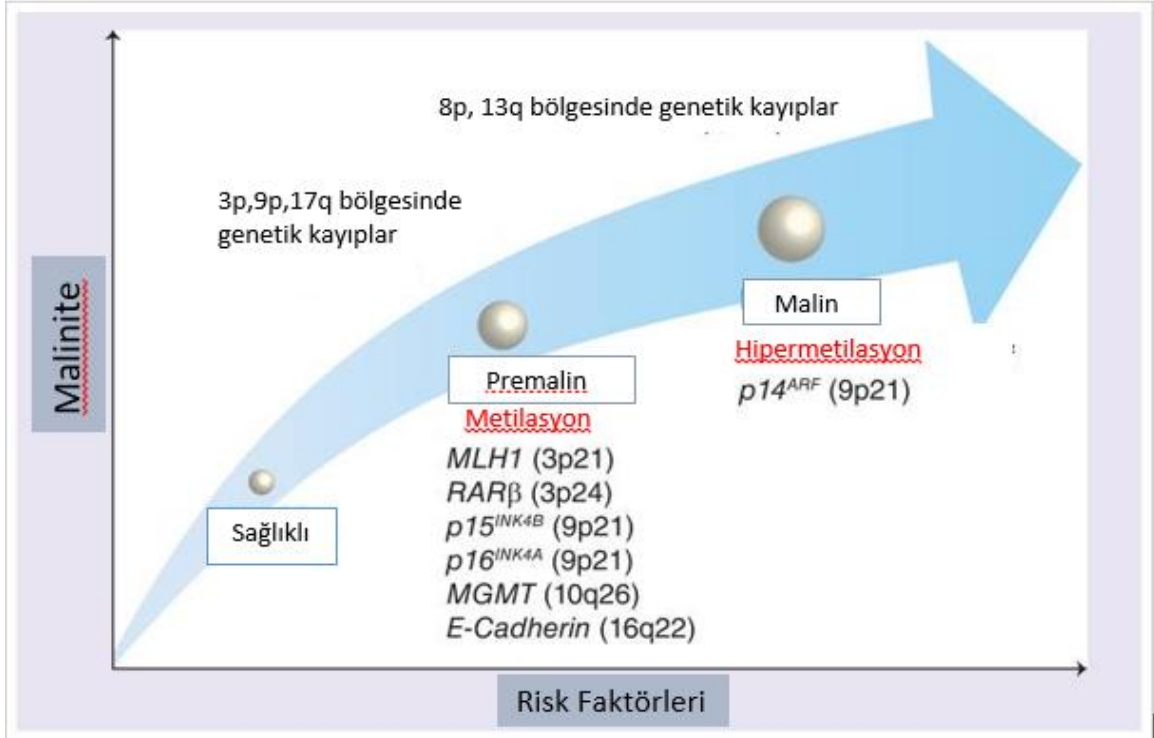
Kemoterapi, lokal ileri OSCC için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ameliyattan önce (indüksiyon tedavisi olarak) veya ameliyattan sonra radyoterapi ile birlikte (kemoradyoterapi) kullanılabilir. Adjuvan kemoradyoterapi, gelişmiş oral kanserler için neredeyse standart bir tedavi haline gelmiştir (Omura, 2014).

Son olarak, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) aşırı ekspresyonunun OSCC’de kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Chen et al., 2003). Monoklonal antikor EGFR inhibitörü gibi hedefli bir ajanın tedaviye ilave edilmesinin, OSCC’de tek başına primer radyoterapiyle karşılaştırıldığında sağkalım sonuçlarını iyileştirdiği belirtilmektedir (Bonner et al., 2006).

2.5. ORAL KAVİTE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

2.5.1. Genetik Değişiklikler

OSCC oluşumunda genetik ve epigenetik faktörler birlikte rol oynamaktadır. Histolojik olarak normal olan dokularda ve premalin lezyonlarda, 3p14 ve 9p21 kromozomlarında heterozigotluk kaybı (LOH) dahil olmak üzere çok çeşitli genetik değişiklikler tespit edilmiş ve bu değişiklikler en erken moleküler değişiklikler arasında olduğu bulunmuştur (Mao et al., 1996). Yapılan çalışmalarla, bu kromozom bölgelerinde tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu ve bu nedenle bu bölgelerde meydana gelen delesyonların neoplastik transformasyona katkıda bulunabileceği kanıtlanmıştır. İyi çalışılmış tümör baskılayıcı bir gen olan p53’ü barındıran kromozom 17p13 bölgesindeki mutasyonlar da, malin transformasyona katkıda bulunan erken olaylar arasındadır (J. O. Boyle et al., 1993).



Şekil 2-3: OSCC progresyonu sırasında ortaya çıkan bazı genetik ve anormal metilasyon değişiklikleri

Şekil 2-3'te oral skuamöz hücreli karsinomun progresyonu sırasında ortaya çıkan bazı genetik ve anormal metilasyon değişiklikleri gösterilmiştir. OSCC ile ilişkili diğer moleküler değişiklikler arasında telomerez aktivitesinin aktivasyonu ve DNA hipermetilasyonu bulunmaktadır (Kupferman & Myers, 2006). Çeşitli bulgular hücrede telomerez aktivitesinin aktifleşmesinin, oral skuamöz hücreli karsinomun ilerlemesinde erken evre olaylarından biri olduğunu göstermektedir (Mao et al., 1996). Erken evrede gerçekleşen bir diğer olay ise genin promoter bölgesindeki CpG adacıkları açısından zengin alanlarda, gen ekspresyonunun susturulmasına sebep olan epigenetik bir olay olan DNA promoter hipermetilasyonudur. Oral kavitenin displastik lezyonlarında, 9p21 kromozomunda bulunan p16INK4a lokusunun hipermetilasyonu sıklıkla gözlenmiştir (Kresty et al., 2002).

Reseptör tirozin kinaz *Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)* baş-boyun kanserlerinde aşırı eksprese olmaktadır ve bu durum kötü prognoz ile ilişkilidir. EGFR'nin temel aktivasyonu sayesinde;

- (1) parakrin ve otokrin epidermal büyüme faktörünün ekspresyonu

(2) işlev kazancı mutasyonları veya

(3) aşırı protein ekspresyonu tüm oral kavite ve baş-boyun kanserlerinin yaklaşık %90'ında gözlenmektedir (Mendelsohn & Baselga, 2003). Bu reseptör yolağı sinyalizasyonu, JAK-STAT, MAPK, PI3K-AKT ve ras dahil olmak üzere çoklu onkojenik ve prosurvival kaskadlarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Gschwind et al., 2004).

STAT3, OSCC'de kapsamlı olarak çalışılmış ve insan tümör örneklerindeki STAT3 ekspresyon seviyesinin hastanın sağkalımı ile ters orantılı olduğu bulunmuştur (Masuda et al., 2002). STAT3 aktivitesi ile birlikte BCL2L1 (BCL-xL), VEGF, siklin D1 ve Bcl-2 dahil olmak üzere bir dizi pro-onkojenik protein hedefinin transkripsiyonu ve ekspresyonu gerçekleşmekte ve bu durum sınırsız hücresel proliferasyon, tümör sağkalımı ve anjiyogeneze yol açmaktadır (Grandis et al., 2000). HPV pozitifliğinin oral kavite kanserlerinde iyi prognoz ile ilişkili olduğu ve HPV ile enfekte olmuş olan tümör hücrelerinin radyo-sensitivitesinin bu durumda daha yüksek olduğu bulunmuştur (Kupferman & Myers, 2006).

2.5.2. Gen-Çevre Etkileşimi, Epigenetik Değişiklikler ve Biyobelirteç Kavramı

Epigenetik, DNA dizisinde değişiklik meydana gelmeksizin, gen ekspresyonunda meydana gelen ve kalıtsal olan değişikliklerin incelenmesi olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik gen paternleri, genetik imprinting, embriyonik gelişim, ve X-kromozom inaktivasyonu gibi çok çeşitli biyolojik olaylarda oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Tsai & Baylin, 2011). Bu süreçlerde meydana gelen bozulmalar metabolik hastalıklara, nörolojik bozukluklara ve kanser gibi çeşitli patolojilere yol açmaktadır (Verma, 2014). Epigenetik mekanizmaların temelini DNA metilasyonu başta olmak üzere, histon modifikasyonları, kromatin yeniden düzenleme ve miRNA deregülasyonu oluşturmaktadır. Bu mekanizmalarda meydana gelen düzensizlikler, anormal gen fonksiyonuna ve buna bağlı olarak gen ekspresyonunun değişmesine neden olur (Kanwal & Gupta, 2010).

Tablo 2-2: Kansere hücrelerinde meydana gelen epigenetik değişimler ve sonuçları

Epigenetik Değişim	Sonuç ve Mekanizma
DNA Hipermetilasyonu	Gen promotorlerinde CpG adacıklarının De novo hipermetilasyonu, genomik ve kromozomal instabilite, artan proliferasyon ile sonuçlanan tümör baskılayıcı genlerin susturulması
DNA Hipometilasyonu	Hücrel onkogenlerin ve transpoze edilebilir elementlerin aktivasyonu, artan proliferasyon, genomik instabilite
Histon Asetilasyonu	Fonksiyon kazanımı veya kaybı, DNA onarımı ve kontrol noktalarında onkogenlerin aktivasyonu
Histon Deasetilasyonu	Tümör supressör genlerin susturulması
Histon Metilasyonu	Kalıtımsal gen ekspresyonu paternlerinin kaybı
miRNA Delesyonu	Neoplastik dönüşümler

Bu epigenetik mekanizmalardan biri, kromatin yapısını değiştirerek gen regülasyonunu düzenleyen ve karsinogenezde önemli rol oynayan histon modifikasyonudur. Histon modifikasyonları, histon asetilasyonu ve metilasyonu, fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumoylasyon ve prolin izomerizasyonu gibi birkaç farklı tip içerebilmektedir (Kouzarides, 2007).

Kromatin, ökaryotik DNA'yı histon proteinlerinin bir oktamersinin etrafına sarılmış daha yüksek dereceli bir kromatin fiber içine paketleyen, düzenli bir yapıdır. Bu oktamersler, H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinin çift alt birimlerinden oluşmaktadır ve histonlar terminal kuyruklarında meydana gelen çoklu posttranslasyonel değişikliklere uğrayabilir (Dillon, 2006). Histon modifikasyonları DNA onarımını düzenlemekte ve transkripsiyonel aktiviteye bağlı olarak genlerin susturulmasında rol oynamaktadır. Örneğin, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, lizin 20'de (H4K20me3) histon H4'ün trimetilasyonunda ve lizin 9'da (H3K9me3) histon H3'ün trimetilasyonunda global bir değişiklik olduğunu bildirmiştir (Bártová et al.,

2008). Histon modifikasyonları ile ilgili spesifik enzimler, ilgili modifikasyonları katalize edebilir veya duraklatabilir. Bu modifikasyonlar nükleozom yapısı ve bunu takiben fonksiyonunun değişmesine ve daha sonra gen aktivitesi düzenlenmesine yol açacak ve birçok biyolojik süreci etkileyecektir. Bu duruma örnek olarak, Polycomb Group (PcG) ve Trithorax Group (TrxG) proteinleri verilebilir. Bu proteinler, histon H3 lizin 4 (H3K4me3) ve H3K27me3'ün trimetilasyonunu katalizleyebilen önemli proteinlerdir (Siebold et al., 2010).

miRNA regülasyonu ise epigenetik mekanizmalardan bir diğeridir. Kromatin regülasyonu ve gen ekspresyonunun modülatörleri kodlayıcı olmayan RNA (ncRNA) adı küçük (200 nükleotid altında) ve büyük (> 200 nükleotid) ncRNAlar olarak kategorize edilir. Bu RNA'ların normal gelişim için giderek öneminin arttığı ve kanser sırasında değişime uğradığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Kodlamayan RNA'lar arasında bulunan miRNA'lar normal hücre fizyolojisi için oldukça önemlidir ve yanlış ekspresyonlarının kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Mitra et al., 2012). Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, kanserleri sınıflandırmak için miRNA profillemeye yöntemi kullanılarak (Calin & Croce, 2006) insan genomundaki yaklaşık 1000 adet miRNA geninin, birden fazla protein kodlayan transkripti hedeflediği hesaplanmıştır (Chuang & Jones, 2007). MiRNA'ların, protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının translasyon oranını düzenlediği ve hücresel işlemlerin düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir (Fabian et al., 2010). miRNA'ların ekspresyon artışı ve azalışı çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, miR-127, miR-124, miR-223 ve miR-17'deki ekspresyon artışları sırasıyla mesane, kolon, akut miyeloid lösemi ve akciğer kanseri ile ilişkili iken; miR-126, miR-146a, miR-9 ve miR-143'deki ekspresyon azalışları sırasıyla meme, prostat, ovaryum ve servikal kanser ile ilişkilidir (Verma, 2014).

Gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmaların karmaşıklığı giderek artmaktadır ve bu mekanizmalar kromatin yapısının aracılık ettiği faktörlerin karmaşık bir etkileşimini, histonlar ve diğer nükleer proteinler üzerinde posttranslasyonel modifikasyonların çapraz etkileşimlerini ve buna bağlı olarak kromatinin yeniden düzenlenmesini içermektedir. Yapılan son çalışmalarda da belirtildiği üzere, bu düzenleyici elemanlarda meydana gelen işlev bozukluklarının hastalığa özgü gen ekspresyonunu yönlendiren gen transkripsiyon programlarında değişikliklere yol

açtığını ve bu nedenle transkripsiyonun tümör büyümesi ve neoplastik transformasyonu tetikleyen önemli bir mekanizma olarak önemini vurgulamaktadır (Kumar et al., 2016).

Ökaryotlarda SWI/SNF (Kasten et al., 2011), ISWI ailesi (Yadon & Tsukiyama, 2011), Mi-2/nükleozom yeniden modelleme ve histon deasetilasyonu (NuRD) (A.Y. & P.A., 2011) ve inositol 80 (INO80) (Bao & Shen, 2011) ailesi dahil olmak üzere en az dört adet kromatin yeniden modelleme kompleksleri vardır. Örneğin kromatin yeniden düzenlenmesinden sorumlu SWI/SNF ailesi, apaoptozu, hücre döngüsünü, farklılaşmayı, genomik instabiliteyi ve DNA onarımını düzenlemektedir.

DNA metilasyonu epigenetik mekanizmalar arasında en çok çalışılan alanlardan biridir. Yapılan çalışmalarla kanıtlandığı üzere epigenetik değişiklikler, çeşitli sinyal yollarının aktivasyonunu veya inaktivasyonunu sağlayarak kansere yol açabilmektedir. Meydana gelen bu değişiklikler tümör progresyonun erken aşamasında ortaya çıktığından, kanserin erken teşhisi ve önlenmesi için biyomarker geliştirilmesi adına, epigenetik değişimlerin detaylı bir şekilde araştırılması şarttır (Reis et al., 2016).

DNA hipometilasyonu, DNA metilasyon seviyesinde azalma olarak tanımlanmaktadır ve bu durumun onkogenleri aktive ettiği, kromozomal instabiliteyi ve çeşitli retrotranspozon elementleri etkilediği gösterilmiştir (Ahuja et al., 2016). Kanser varlığında, bu mekanizma bozulmakta ve normal olarak inaktive edilmiş bölgelerde DNA metilasyonu kaybı meydana gelmektedir. DNA hipometilasyonundan etkilenen promoterlerin çoğu dokuya özgü genlere aittir. Örnek vermek gerekirse, normal şartlar altında yetişkin testis germ hücreleriyle sınırlı olan kanser/testis (CT) antijenleri ailesinin, çeşitli kanser tiplerinde anormal şekilde aktive olduğu bildirilmiştir (Caballero & Chen, 2009) ve melanom ve kolorektal kanserde, melanomla ilişkili CT antijeni MAGE, promoter bölgesinin DNA hipometilasyonu ile yeniden aktifleştirilmektedir (Kim et al., 2006).

Mezotelin (MSLN) promoterindeki hipometilasyon mezotelyoma (Tan et al., 2010), Alu ve LINE-1 retrotranspozonların hipometilasyonu ise sıklıkla akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Daskalos et al., 2009).

Anormal DNA metilasyonu genellikle kanserin başlangıcı ve proliferasyonu sırasında transkripsiyon faktörlerinin promoter bölgelerinde gerçekleşmektedir (Klutstein et al., 2016).

DNA hipermetilasyonu sitozin bazının 5' ucuna bir adet metil grubu eklenmesiyle meydana gelen kovalent bir modifikasyondur ve bu olay DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b dahil olmak üzere DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) tarafından katalize edilmektedir (Jones & Baylin, 2002). DNA hipermetilasyonu sitozin ve guanin bazının yoğun olduğu ve CpG adacıkları olarak adlandırılan bölgede gerçekleşmektedir (Rodríguez-Paredes & Esteller, 2011). Anormal DNA hipermetilasyonu çeşitli sinyal yollarına etki etmekte ve buna bağlı olarak başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır (Riggs & Jones, 1983). Ovaryum, meme, kolon ve serviks kanseri hücreleri gibi çeşitli tümör hücrelerinde anormal DNA metilasyonu araştırılmış ve bu durumun çeşitli onkogen veya tümör supressör genlerin ifadesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Pan et al., 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalarla da kanıtlandığı üzere DNA hipermetilasyonunun erken evre tümörlerde moleküler değişikliklerin mükemmel bir şekilde temsili olduğu gösterilmiştir.

Farklı kanser tiplerine göre promoter bölgelerinde metilasyon gözlenen genler ve bu genlerin fonksiyonları tablo 2-3'de gösterilmiştir.

Tablo 2-3: Farklı kanser tiplerine göre promoter bölgelerinde metilasyon gözlenen genler ve bu genlerin fonksiyonları

Gen	Fonksiyon	Meme	Akciğer	Prostat	Lösemi	Kolon
APC	WNT sinyal yolağının düzenlenmesi	+	+	+	-	+
BRCA1	DNA tamir mekanizması	+	-	-	-	-
CDH1	E-kaderin düzenleyici ve hücre yapışması	+	+	+	+	+
CDKN2A	G1 fazında hücre döngüsü kontrolü, CDK4 inhibitörü	+	+	+	+	+
CDKN2B	Hücre döngüsü G1 ilerlemesi, CDK4/CDK6 inhibitörü	-	-	-	+	-
COX2	Prostaglandin biyosentezi	-	-	-	-	+
DAPK1	Apoptoz	-	+	-	+	+
MGMT	DNA tamir mekanizması	-	+	-	+	+
MLH1	DNA yanlış eşleşme onarımı, DNA hasar sinyalizasyonu	-	-	-	-	+
RASSF1A	G1/S fazında hücre döngüsü durdurulması sırasında rol alan siklin D1 birikiminin önlenmesi	+	+	+	+	+

*X: bildirilen hipermetilasyon.

Bu bulgulara bağılı olarak epigenetik mekanizmalar da çeşitli kanserlerde biyobelirteç olarak kullanılabilir. Biyobelirteçler, kan, vücut sıvısı veya dokuda bulunan ve klinik olarak ölçülebilen moleküllere verilen isimdir. Vücudun hastalıklara veya uygulanan tedaviye olan etkisini gözlemlemek için biyobelirteçler kullanılmaktadır (Califf, 2018). Günümüzde çeşitli kanserlerin tanısında belirli biyobelirteçler kullanılmaktadır. Örneğin, prostat kanseri için PSA, kolorektal kanserler için FOBT, hepatosellüler kanserler için AFP ve over kanserleri için CA 125 kullanılan biyobelirteçlerden bazılarıdır (Bottoni & Scatena, 2015).

Kanser tanısında, tedavi sürecinde ve takibinde epigenetiğin önemi de oldukça fazladır. DNA metilasyonu kanserde erken evrede meydana gelen bir olay olduğundan malitenin tanısı için biyobelirteç olarak kullanılabilir (Pan et al., 2018). Aynı zamanda primer tümör örneğinde meydana gelen DNA metilasyonu ile histon modifikasyonlarının tanımlanması ve bu sayede geliştirilen biyobelirteç, prognozun belirlenmesine ve hastanın tedaviye olan yanıtının iyileştirilmesine yardımcı olacaktır. Örneğin, hücre döngüsünün düzenlemesinde rol oynayan ve tümör supressör özelliği gösteren bir gen olan *PTEN*'de meydana gelen değişiklikler, prostat kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Bottoni & Scatena, 2015). Oral skuamöz hücreli karsinom ve oral premalin lezyon örnekleri ile sağlıklı dokular kıyaslandığında ise tümör dokularının metilasyon seviyelerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir (Gasche & Goel, 2012).

Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının yaptığı TÜBİTAK-SBAG-114S497 no'lu çalışmada premalin lezyonlardan, lökoplaki, oral liken planus ve oral likenoid displazi altgruplarının moleküler yapısının incelenmesi, OSCC/OPML tanılı hastalarda non-invaziv tanı yöntemi geliştirmek adına vücut sıvılarında doğrulanması ve erken tanı, tarama ve premalin/malin lezyonların histopatolojik ayırımında kullanılacak yeni metilasyon biyobelirteçlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. OPML ve OSCC hastalarının tümör dokusu ve eşlenik normal doku materyalleri ile gerçekleştirilen ekspresyon ve metilasyon array verilerine göre *Tubulin Folding Cofactor D (TBCD)* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon nedeniyle metilasyona bağılı ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Oral

likenoid displazi tümör-normal doku karşılaştırmasında *TBCD* genine ait probe ID'si verilen CpG bölgelerinde tümör grupları metillenmiş buna bağlı olarak ekspresyon seviyeleri down regüle olmuştur. *TBCD* geninin hipermetilasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 2-4). Buna bağlı olarak tezimizde geniş hasta grubunda ileri validasyon ve potansiyel biyobelirteç adaylığını tespit etme amaçlı *TBCD* geninin promoter bölgesindeki metilasyona bağlı ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki incelenmiştir.

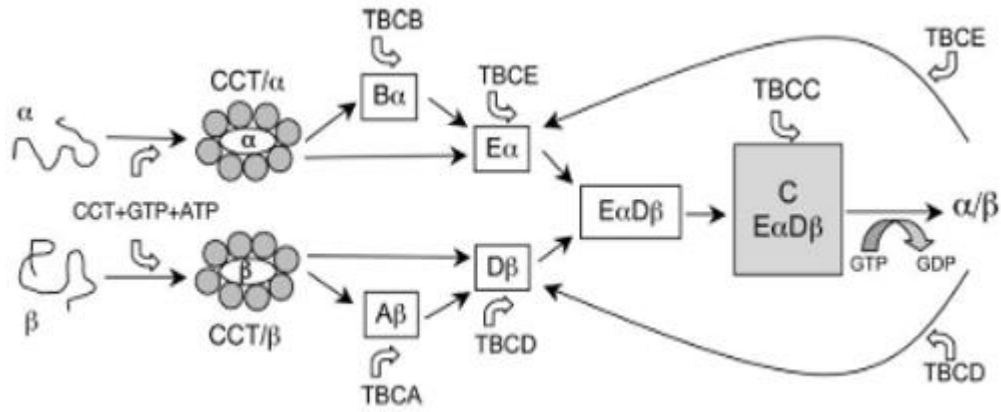
Tablo 2-4: Oral likenoid displazi tümör-normal doku karşılaştırmasında *TBCD* genine ait beta ve fold change değerleri

Target ID	ELP Tumor.AVG_Beta	ELP Normal.AVG_Beta	DiffScore	Tespit edilen P değeri	UCSC_REFGENE_ NAME Değişiklik Gözlendi Genler	Fold Change	UP/DOWN	Ekspresyon P değeri
cg10377414	0.6316828	0.5326856	13.56462	0.005	TBCD	-1.0958837	down	0.059359256

2.6. Mikrotübül Organizasyonunda Rol Oynayan *Tubulin Folding Cofactor D (TBCD)* Geni

Mikrotübüller 25 nm çapında α - β tübülün heterodimerlerinden oluşan tübüler polimerlerdir (Eva Nogales et al., 1999). Tüm ökaryotik hücre iskeletinin temel bileşenleri olan mikrotübüller, hücre morfolojisi, migrasyonu, polarizasyonu, ve hücre içi taşıma gibi bir dizi fonksiyonda yer almaktadırlar (E. Nogales, 2001).

Sitozolik şaperon (CCT), tübülün kofaktörleri (TBCE, TBCB, TBCC, TBCD, TBCE) ve ARL2 GTPaz olarak adlandırılan beş ek ko-şaperona bağlıdır (Lewis et al., 1997) (Lopez-Fanarraga et al., 2001). Tübülün heterodimerleri kendiliğinden birleşemediğinden hem α hem de β tübülünler, CCT'nin ATP'ye bağlı etkileşimi ile bir veya bir kaç katlanma sonrası birleşirler (Lewis et al., 1996). TBCE ve TBCD β -tübülün ile etkileşirken, TBCB ve TBCE α -tübülün ile etkileşime girer. TBCE- α ve TBCD- β birbirleriyle etkileşime girerek multimoleküler bir kompleks oluşturmakta ve ardından TBCC bu komplekse girerek, β -tubulin tarafından GTP hidrolizi üzerinden doğal tübülün heterodimerlerini serbest bırakan bir süper kompleks oluşturmaktadır (Tian et al., 1997). TBCC, TBCD ve TBCE'nin bu reaksiyonlara katılımı ökaryotlarda önemlidir. Şekil 2-4'te ökaryotlarda tübülün heterodimer birleşim yolu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Yüksek ökaryotlarda tübülün heterodimer birleşim yolunun şematik gösterimi

Tubulin Folding Cofactor D (TBCD), mikrotübül alt birimi α - β -tübülün heterodimerlerinin birleşip ayrılması için gerekli olan 5 tübülün ko-şaperondan (TBC: A-E) biridir (Tian et al., 1997) ve iç mikrotübül dinamiğinin stabilizasyonu için oldukça önemlidir (Tian et al., 2010). TBCD'nin hastalığa neden olan varyantları mikrotübül stabilitesini ve işlevini etkileyerek bozulan mikrotübül dinamiği ile sonuçlanır. TBCD varyantları yakın zamanda erken başlangıçlı kortikal atrofi, progresif nörodejenerasyon ve nöbetler ile başvuran bir grup hastada tanımlanmıştır (Flex et al., 2016)(Miyake et al., 2016)(Pode-Shakked et al., 2017). Otozomal resesif hastalıklarda *TBC* geninin biallelik varyantları, TBCD protein ekspresyonlarının azalmasına ve buna bağlı olarak α - β -tubulin heterodimer oluşumunun azalmasına sebep olmaktadır. Bu durum mikrotübül dinamiklerinin fonksiyonel olarak değişmesine, mikrotübülün hızlandırılmış polimerizasyonuna ve stabilitesinin artmasına neden olmuştur. Bozuk mikrotübül dinamikleri normal nöronal fonksiyonu ve hücrel sağkalımı bozmaktadır (Pode-Shakked et al., 2017).

Yapılan çalışmalardan birinde CD4+T hücrelerinde genom çapında DNA metilasyonu incelenmiş ve bu çalışmada 12 romatoid artrit hastası ve bu hastaların eşlenik normalleri incelenerek, *TBCD* geninde hipermetilasyon saptanmıştır (S. Guo et al., 2017).

Tüm bu hastalıklara ek olarak, yakın zamanda yapılan bir çalışmada *TBCD*'nin aşırı ekspresyonu kronik lenfositik lösemide, insan genomunun %25'inden fazlasını

oluşturan LINE-1 ve Alu gibi retrotranspozonların promoter bölgelerinde meydana gelen metilasyon kaybı ile ilişkilendirilmiştir (Barrow et al., 2020).

Tübülün organizasyonunda meydana gelen değişimlerin ve farklılaşmaların çeşitli kanser tiplerinde önemli olabileceği bilinmektedir. Bazı tübülün izotipleri, normal ve neoplastik hücrelerde farklı şekilde eksprese edilmektedir (Binarová & Tuszynski, 2019). Örneğin, β II-tübülünün, nöroepitelyal ve beyin tümörleri gibi çeşitli tümör türlerinin yanı sıra kolon ve prostat kanserinin gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (Yeh & Ludueña, 2004).

Çalışmamızda, OSCC/OPML gruplarında tümör ve eşlenik normal doku ile vücut sıvı (serum ve tükürük) örneklerinde *TBCD* geninin promoter bölgesindeki metilasyon durumu ile metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi, sağlıklı popülasyon ile karşılaştırarak daha geniş hasta grubunda ileri validasyonunun sağlanması ve edinilen bilgiler doğrultusunda literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez projemiz için İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan OPML hastaları ile İstanbul Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları/Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan OSCC hastalarına ve sağlıklı bireylere ait doku ve vücut sıvısı örnekleri bireylerden rıza ve gönüllü onam formları alınarak toplandı.

Doku ve periferik kandan elde edilen serum örnekleri -80°C'de saklandı ve mikrodiseksiyon sonrasında %70 saflık derecesine sahip olan tümör dokuları deneye dahil edildi.

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Agaroze Jel Elektroforez Tankı (BRL Life Technologies, ABD)
- Ultra Derin Dondurucu (-80 °C) (Sanyo, Japonya)
- El homojenizatörü (Qiagen, Almanya)
- Etüv (Hereaus, Almanya)
- Güç Kaynağı (Bio-Metra, Almanya)
- Hassas Terazisi (Chyo, Japonya)
- Jel Dökümentasyon Sistemi (Vilber- Lourmat, Almanya)
- LightCycler 480 Real Time cihazı (ROCHE, Almanya)
- Mikropipetler (Thermo, İsveç)
- Nanodrop Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Otoklav (Hiramaya, Japonya)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich Mikro 200R, Almanya)
- Vorteks (Snijders, Hollanda)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Agaroze (Wisent MultiCell, Kanada)

- Borik asit (Wisent MultiCell, Kanada)
- Orange G (Merck, Almanya)
- Deoksiribonükleotid trifosfat (Fermentas, Litvanya)
- Ethanol (Riedel De Haen, Almanya)
- Etilen-diamin-tetraasetik-asit (Sigma, Almanya)
- Etidyum Bromür (Sigma, Almanya)
- Taq Polimeraz (Thermo Scientific, Almanya)
- İsoopropanol (Riedel De Haen, Almanya)
- Magnezyum Klorür (Thermo, Litvanya)
- Proteinaz K (Roche, Almanya)
- Ribonükleaz A (Sigma Aldrich, ABD)
- SssI metilaz enzimi (New England Biolabs (NEB), ABD)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya)
- Tris (Applichem, Almanya)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Karışımlar

Deneylerin gerçekleştirilmesi için kullanılan kimyasal karışımlar ile içerikleri Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

Parçalama Tamponu	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0.1 mM EDTA (pH: 8.0)
SE Tamponu	75 mM NaCl 25 mM EDTA 30 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
TE Tamponu	20 mM Tris-HCl (pH: 8.0) 1 mM EDTA (pH: 8.0)
Fenol için TE Tamponu (0,5 ml)	0.25 mM Tris (pH:8.0) 0, 5 mM EDTA (pH:8.0)

Fenol/Kloroform/İsopropanol	(1:1):1 (Fenol/Kloroform) / İsopropanol
Proteinaz K	20 mg / ml
Ribonükleaz A	10 mg / ml
SDS (%10; pH:7,2)	100 g sodyumdodesilsülfat

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi

3.2.1.1. Doku Eldesi

İstanbul Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları/Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından OSCC tanısı almış 30 hasta ve İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından OPML tanısı almış 30 hastadan cerrahi müdahalesi sırasında 0,5 cm çapında tümör ve eşlenik normal doku örneği alındı. OSCC tanısı alanlardan uzak metastazı olan hastalar opere edilmediği için çalışmaya dahil edilmedi. Bunlara ek olarak bireyde ve ailesinde benin ve malin hikaye bulunmayan ve herhangi bir sebeple cerrahi uygulanmasına karar verilen 15 bireyden 0,5 cm çapında mukoza örneği alındı. Ameliyat sırasında toplanan örnekler daha sonra buz içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara teslim edildi ve DNA/RNA izolasyon işlemlerine dek -80'de saklandı.

3.2.1.2. Serum Eldesi

Hasta ve sağlıklı bireylere cerrahi müdahale uygulanmadan önce, periferik kan örnekleri 8-10 mL olacak şekilde serum ayırma tüpüne alındı. Tüpler laboratuvarında 1950 rpm/30 dakika santrifüj edildikten sonra üstte kalan serum kriyotüplere dağıtıldı.

3.2.1.3. Tükürük Eldesi

Çalışmaya dahil olan hasta ve sağlıklı bireylerden tükürük toplama işlemi sırasında ağız içi 1 dk süre ile çalkalanarak temizlendi. 5 dk süresince ağız içerisinde biriktirilen tükürük tüm oral mukozada dolaştırıldı ve bu işlem gerekli tükürük miktarı (5 mL) toplanana dek devam ettirildi. Tükürük eldesi tamamlandıktan sonra kap etiketlenerek laboratuvara teslim edildi ve örnekler izotonik su ile 1:1 oranında sulandırılarak 1950 rpm/5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırıldı ve geriye kalan pellet üzerine 3 mL PBS eklenerek kalan materyal 1 mL olacak şekilde kriyotüplere bölüştürüldü. Bölüştürülen materyallere tekrar 1950 rpm/3 dk santrifüj

uygulandı ve üst sıvının dökülmesinde sonra pelletler ileriki izolasyon işlemlerinde kullanılmak için -80°C'de muhafaza edildi.

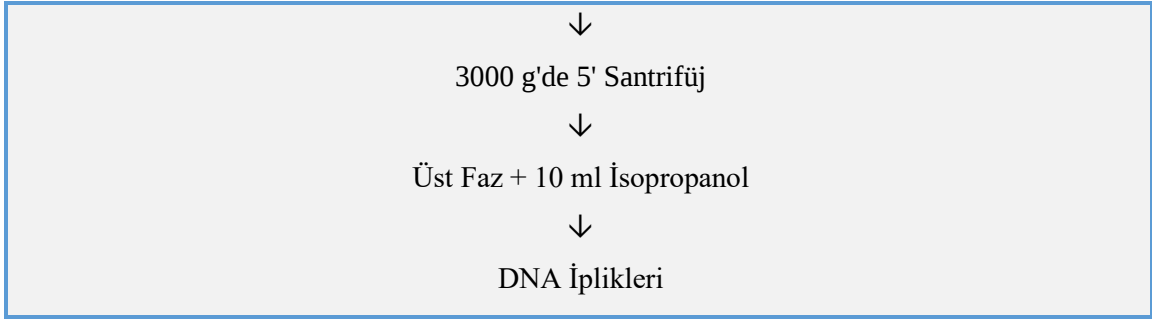
3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri

3.2.2.1. Dokudan DNA İzolasyonu

Dokular homojenizatörle parçalandıktan sonra proteinaz K (Boehringer-Mannheim, Germany) kullanılarak 48°C'de gece boyunca inkübe edildi. Bu aşamanın ardından fenol/kloroform ekstraksiyonu ile DNA iplikçiklerinin eldesi sağlandı. DNA miktarlarının ölçümü ile DNA örneklerinin kontrolü %0,8'lik agaroz gel elektroforezinde yapıldı ve örnekler Nanodrop 2000® (Thermofisher, ABD) ile ölçüldü. Daha sonra bisülfite modifikasyonunda kullanılması için -20°C'de saklandı. Toplanan hasta ve sağlıklı bireylere ait tümör-eşlenik normal doku örneklerinden DNA eldesi Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Dokudan DNA izolasyon işlemi

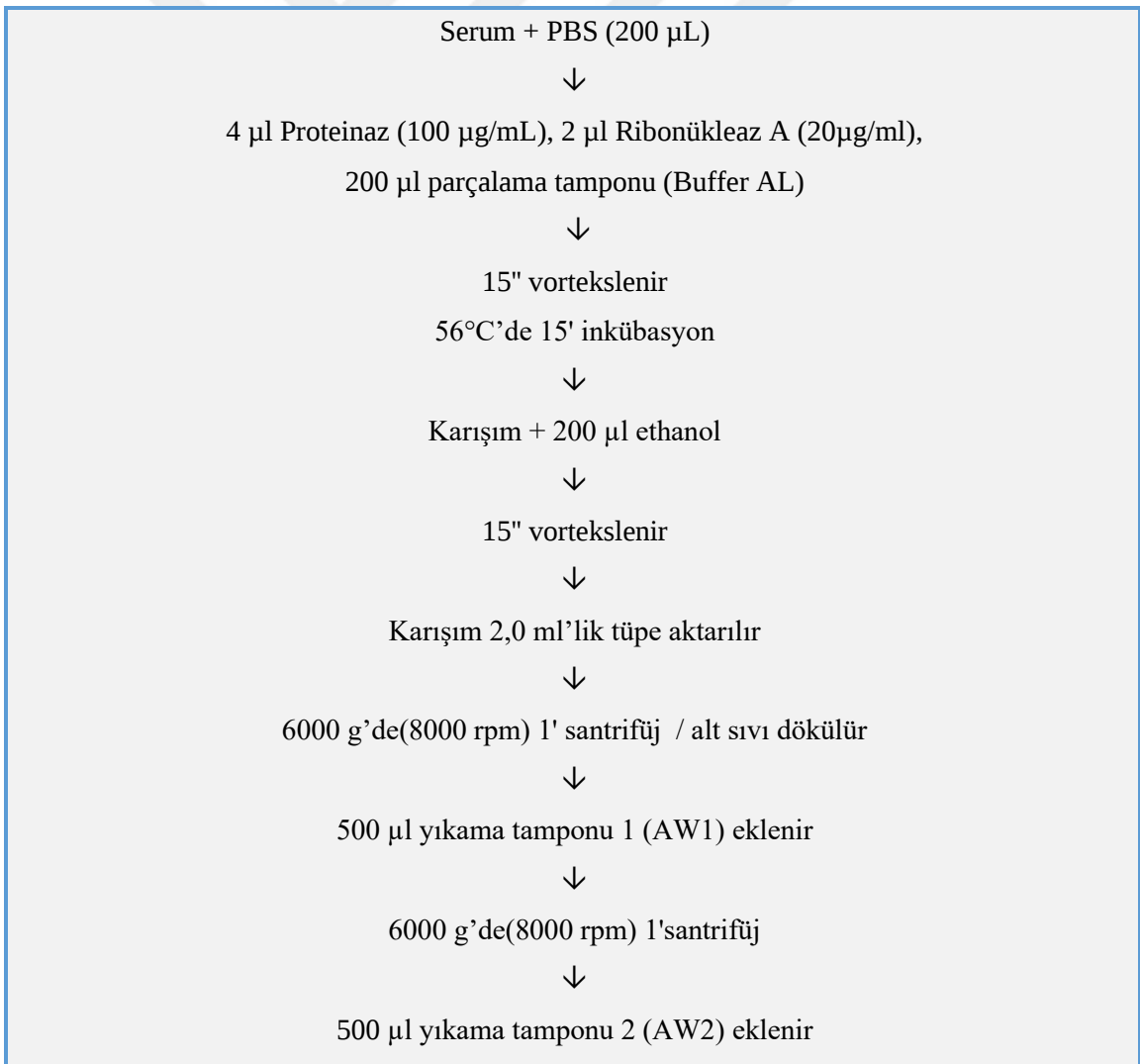




3.2.2.2. Serumdan DNA İzolasyonu

Serum örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Almanya) kullanılarak kit protokolüne uygun gerçekleştirildi ve adımlar tablo 3.2-3'de gösterildi. Sonrasında elde edilen örnekler -20'de muhafaza edildi.

Tablo 3-3: Serumdan DNA izolasyon işlemi



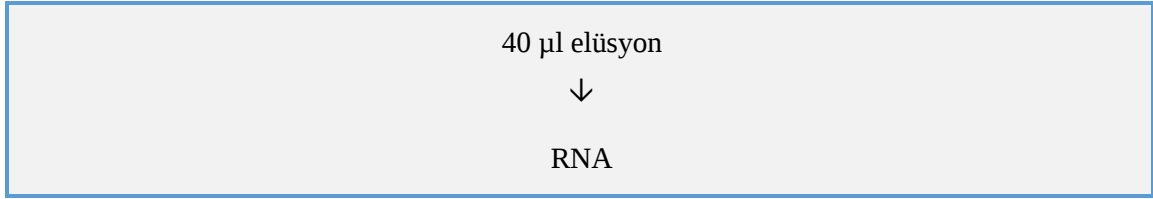


3.2.3. Total RNA İzolasyonu

Doku örneklerinin RNA izolasyonu “Norgen Total RNA Purification Kit” (Norgen, Ontario, Kanada) protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve bu aşamalar Tablo 3-4’te gösterilmiştir. Elde edilen RNA’ların spektrofotometrik ölçümü Nanodrop 2000© (Thermofisher, ABD) ile gerçekleştirilerek, cDNA dönüşümü işlemine kadar -80°C’ de saklandı.

Tablo 3-4: RNA izolasyon işlemi





3.2.4. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Dizileri Tasarımı

Çalışmamızda incelenen *TBCD* geninin metilasyon ve ekspresyon profilinin incelenmesi için gerekli primer ve prob dizilerinin tasarımı internette kullanıma açık Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>), Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) ve Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) programları yardımıyla tarafımızca tasarlanmıştır (Tablo 3-5). Tablo 3-6'da gösterilen ve çalışmamızda referans gen olarak kullandığımız *ACTB* geninin primer ve prob dizileri daha önce yapılmış olan çalışmalardan alınmıştır (Carvalho et al., 2008).

Tablo 3-5: Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *TBCD* geninin primer ve prob dizileri. (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers)

<i>TBCD</i> EF	5' CTGTTGGACCCGCACCTTG '3
<i>TBCD</i> ER	5'ACAGGCTCTACATCGGCAAC '3
<i>TBCD</i> MF	5' TTGCGGCGATTTAGGGGAAA '3
<i>TBCD</i> MR	5' GAAACGAACCCCGAAACCCA 3'
<i>TBCD</i> Probe	5' TTATTCGGCGCGGGGTTTCGTGTGAT '3

Tablo 3-6: Referans *ACTB* geninin primer ve prob dizileri. (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers)

<i>ACTB</i> ER	5' GTCTTCCCCTCCATCGTG '3
<i>ACTB</i> EF	5' AGGGTGAGGATGCCTCTCTT '3
<i>ACTB</i> MF	5' TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT '3
<i>ACTB</i> MR	5' AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA '3
<i>ACTB</i> Probe	5' ACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA '3

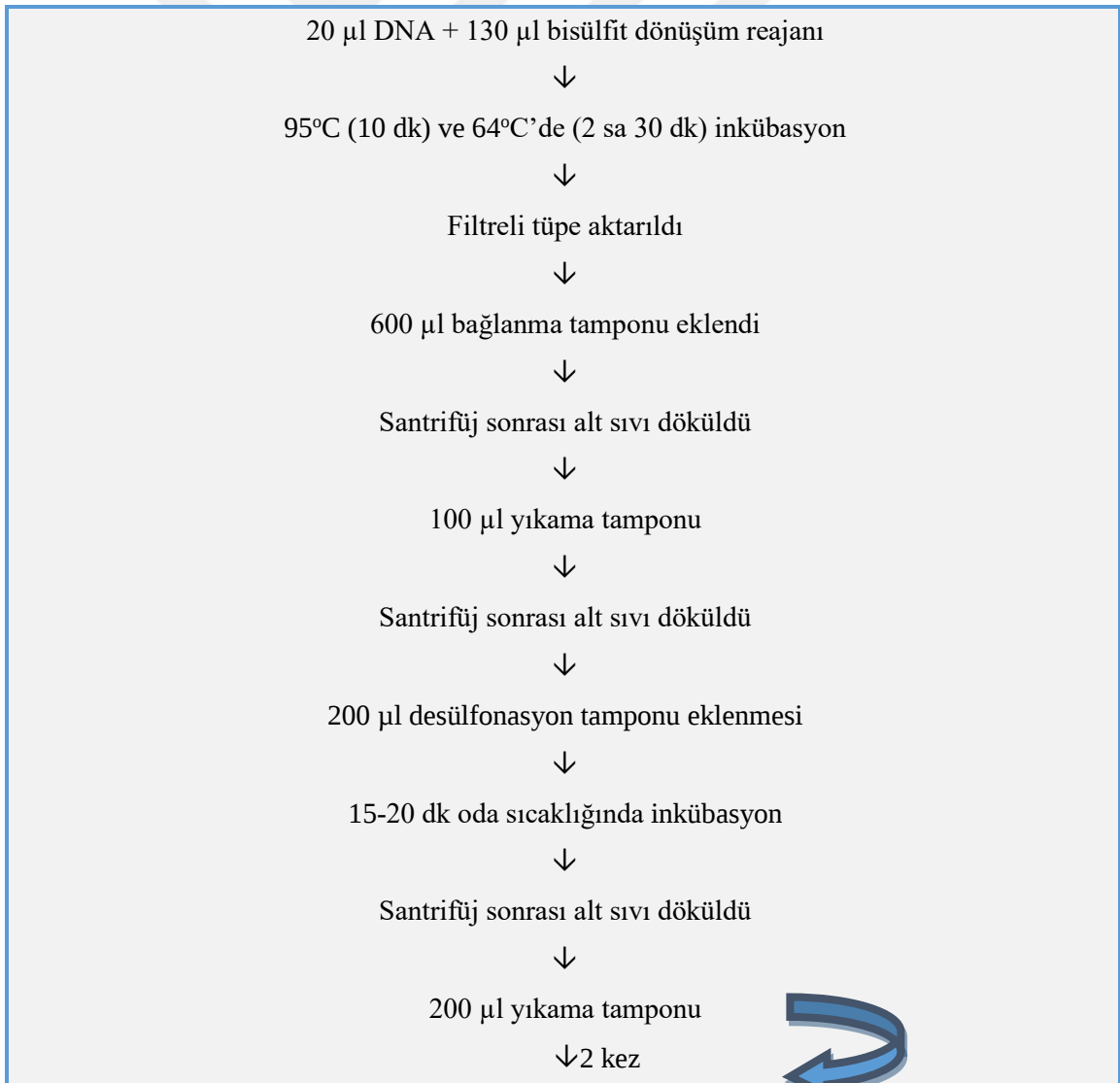
3.2.5. Metilasyon Analizi

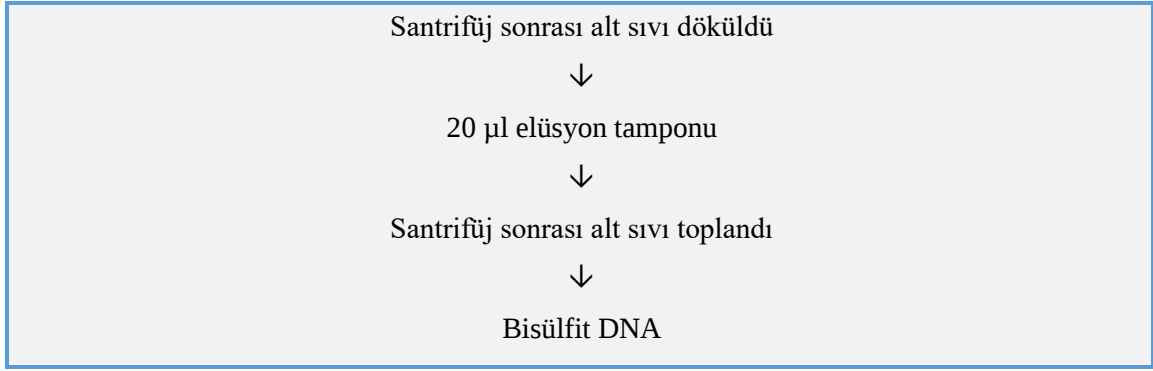
OSCC ve OPML hastalarına ait tümör/eşlenik normal dokular ile vücut sıvısı örneklerinden ve sağlıklı kişilere ait normal mukoza ile vücut sıvısı örneklerinden elde edilen DNA örnekleri üzerinde *TBCD* geninin promoter bölgesinde metilasyon varlığı LightCycler 480 cihazında RT-PCR yöntemi kullanılarak incelendi.

3.2.5.1. Bisülfite Modifikasyon İşlemi

OSCC ve OPML tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylere ait tümör/eşlenik normal doku ile vücut sıvısı örneklerinden elde edilmiş DNA örneklerinin bisülfite modifikasyonu “Zymo Methylation Gold Kit”(Zymo research, CA, ABD) kullanılarak Tablo 3-7’deki protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Bisülfite modifikasyonu gerçekleştirilen DNA örnekleri bir sonraki aşamaya kadar -20 °C ‘de saklandı.

Tablo 3-7: Bisülfite DNA dönüşüm protokolü





3.2.5.2. *TBCD* geninin relatif metilasyon seviyesinin QMSP ile belirlenmesi

TBCD geninin promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin araştırılmasında Kantitatif Metilasyon Spesifik PCR (QMSP) yöntemi kullanıldı. Deneylerde, 5' ucunda 6-florosein amitid (FAM) ve 3' ucunda FAM inhibe edici (quencher) olan karboksitetrametilrodamin (TAMRA) ile işaretlenmiş TaqMan hidroliz probu kullanıldı.

Pozitif kontrol olarak, sağlıklı insana ait lenfosit DNA'sı (LN-DNA), SssI metilaz enzimi ile muamele edildi ve %100 metillenmiş standart kullanıldı. Standartlar kantitatif sonuç elde etmek için, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 şeklinde dilüe edildi. QMSP deneylerinde kullanılan reaksiyon karışımı ve koşulları Tablo 3-8 ve Tablo 3-9'da gösterilmiştir.

Tablo 3-8: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek hacmi
10X SensiFAST Probe No-ROX Kit Mix	10 µL
100 µM Primer (F)	1,2 µL
100 µM Primer (R)	1,2 µL
100 µM prob	0,4 µL
dH ₂ O (PCR grade)	2,2 µL
bcDNA	5,0 µL

Tablo 3-9: Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon koşulları.

PCR Aşamaları	T (°C)	Zaman
DENATÜRASYON	95°C	30 s
	95°C	15 s
BAĞLANMA (50 siklus)	64°C	1 dk
	72°C	15s
SOĞUMA	40°C	30 s

Her bir deneyde *TBCD* ve *ACTB* geni için ortak eşik değeri (threshold) belirlendi. Her gen için ayrı kullanılan, %100 metile standart ve dilüsyonlarının konsantrasyonlarının standart eğri grafiği, Ct değerlerine (floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü) göre program tarafından oluşturuldu. Her örnek için ayrı kantitatif sonuç elde edildi. Relatif metilasyon yüzdesi aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı.

$$\text{Metilasyon \%} = \frac{\text{HEDEF}_{\text{konsantrasyon}}}{\text{HEDEF}_{\text{konsantrasyon}} + \text{ACTB}_{\text{konsantrasyon}}} \times 100$$

3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi

RT-PCR yöntemi kullanılarak *TBCD* geninin ekspresyon düzeyleri belirlendi ve OSCC ve OPML tanısı alan hastalara ait tümör ve eşlenik normal doku ile vücut sıvısı örnekleri ve sağlıklı bireylere ait mukoza ile vücut sıvısı örnekleri karşılaştırıldı. Dokudan total RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve elde edilen RNA örneklerinin kalitesi ve miktarı spektrofotometre ile ölçüldü. Ardından RNA örneklerinden SensiFAST cDNA Sentez Kit (BIOLINE, Avustralya) protokolüne uygun olarak ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar -20°C 'de saklandı. cDNA sentez reaksiyon karışımı ve koşulları sırasıyla Tablo 3-10 ve Tablo 3-11'de verilmiştir.

Tablo 3-10: cDNA sentezi reaksiyon karışımı

<i>Solüsyon</i>	<i>Miktar</i>
<i>Toplam RNA (1 µg'ye kadar)</i>	n µl
<i>5x TransAmp Buffer</i>	4 µl
<i>Reverse Transkriptaz</i>	1 µl
<i>dH₂O</i>	20 µl'ye kadar

Tablo 3-11: cDNA sentezi reaksiyon koşulları

PCR Aşaması	T (°C)	Zaman
Primer Bağlanma	25 °C	10 dk
Revers Transkripsiyon	42 °C	15 dk
	48 °C	15 dk

İnaktivasyon	85 °C	5 dk
Soğuma	4 °C	-

3.2.6.1. TBCD Geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi

TBCD geninin ekspresyon seviyesi SYBR Green temelli Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR) ile değerlendirildi. PCR için Tablo 3-12’de gösterilen uygun reaksiyon karışımı hazırlandı ve bu karışım 96 kuyulu platelere, kuyucuk başına 20 µl hacimde olmak üzere multichannel pipet ile dağıtıldı. Daha sonra genlere özgü sıcaklıklarda reaksiyon başlatıldı (Tablo 3-13).

Tablo 3-12: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı

Reaksiyon Karışımı	1 örnek hacmi
10X SensiFAST SYBR NO-ROX Kit Mix	10 µL
100 µM Primer (F)	0,2 µL
100 µM Primer (R)	0,2 µL
dH ₂ O (PCR grade)	6,6 µL
cDNA	3 µL

Tablo 3-13: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon koşulları

PCR Aşamaları	T (°C)	Zaman
DENATÜRASYON	95°C	30 s
BAĞLANMA (40 siklus)	95°C	15 s
	60°C	1 dk
ERİME ERİŞİ (Melting Curve)	95°C	10 s
	60°C	20 s
	95°C	Cont.
SOĞUMA	40°C	30 s

PCR sonrasında genlerin relatif ekspresyon düzeyleri housekeeping genlerin ekspresyon düzeyleri ile normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplandı.

$$\Delta\Delta C_t = (C_{thedef} - C_{treferans})_{örnek} - (C_{thedef} - C_{treferans})_{kontrol}$$

3.2.7. Veri Analizi

İstatiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde IBM SPSS Statistics 21 ve GraphPad 8.0 (free trial) programları kullanıldı. Klinik bilgiler ile metilasyon/ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmaları için ki-kare testi (Yates ve Fisher), Anova testi kullanıldı ve $p \leq 0,05$ olan değerler istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta ile sağlıklı bireylere ait örneklerinin metilasyon seviyelerinin kıyaslanmasında ise Wilcoxon Rank Testi kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Demografik ve Klinik Özellikler

Çalışmamıza 30 malin, 30 premalin ve 15 sağlıklı birey olmak üzere toplam 75 kişi dahil edilmiştir.

Çalışmaya katılan malin hasta grubu yaş ortalaması 58,6'dır ve erkek katılımcı oranı (%73,3) kadın katılımcı oranından (%26,7) fazladır. Hastaların %60'ı (18/30) sigara ve %26,6'sı (8/30) alkol kullanmaktadır. Malin hastalarda tümör anatomik olarak %33,3 (10/30) dil, %20 (6/30) bukkal mukoza, %10 (3/30) inferior alveolar arkus, %16,6 (5/30) ağız tabanı, %13,3 (4/30) retromolar trigon ve %6,6 (2/30) sert damak tutulumu göstermektedir. TNM evrelemesine göre malin grupta bulunan hastaların %56,67'si (17/30) evre IV, %20'si (6/30) evre III , %16,67'si (5/30) evre II, ve %6,6'sı (2/30) evre I'dir.

Çalışmaya katılan premalin hasta grubunun yaş ortalaması 50,27'dir. Premalin hasta grubunda kadın oranı (%50) ve erkek oranı (%50) eşittir. Hastaların %56,6'sı (17/30) sigara ve %20'si (6/30) alkol kullanmaktadır. Premalin grubundaki hastalar histopatolojik tanılarına göre sınıflandırılmakta olup, %23,3'ü (7/30) oral lökoplaki, %13,3'ü (10/30) oral likenoid displazi ve %43,3'ü (13/30) liken planus tanısı almıştır.

Çalışmaya katılan sağlıklı bireylerin yaş ortalaması 46,1'dir olup, erkek oranı (%53,33) kadın oranından (%46,67) fazladır. Katılımcıların %26,67'si (4/15) sigara, %26,67'si (4/15) alkol kullanmaktadır.

Yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre sağlıklı grubun yaş ortalaması ve sigara kullanım oranı malin ve premalin gruba göre daha düşüktür.

Tablo 4-1: Çalışmaya katılanların demografik özellikleri

		Toplam		Malign		Premalign		Sağlıklı	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Yaş ortalaması		55,30±12,76		58,6		50,27		46,1	
Cinsiyet	Erkek	45	(60,00)	22	(73,33)	15	(50,00)	8	(53,33)
	Kadın	30	(40,00)	8	(26,67)	15	(50,00)	7	(46,67)
Sigara	Yok	36	(48,00)	12	(40,00)	13	(43,33)	11	(73,33)
	Var	39	(52,00)	18	(60,00)	17	(56,67)	4	(26,67)
Alkol	Yok	57	(76,00)	22	(73,33)	24	(80,00)	11	(73,33)
	Var	18	(24,00)	8	(26,67)	6	(20,00)	4	(26,67)

Tablo 4-2: Malin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri

		N	(%)
Cinsiyet	Kadın	8/30	%26,67
	Erkek	22/30	%73,33
Yaş	≤50	9/30	%30
	>50	21/30	%70
Anatomik Tutulum	Dil	10/30	%33,3
	Inferior Alveolar Arkus	3/30	%10
	Ağız Tabanı	5/30	%16,6
	Retromolar Trigon	4/30	%13,3
	Bukkal Mukoza	6/30	%20
	Sert Damak	2/30	%6,6
Sigara Tüketimi	Yok	12/30	%40
	Var	18/30	%60
Alkol Tüketimi	Yok	22/30	%73,33
	Var	8/30	%26,67
Evre	I	2/30	%6,6
	II	5/30	%16,67
	III	6/30	%20
	IV	17/30	%56,67
Metastaz	Yok	20/30	%66,67
	Var	10/30	%33,3
Differasyon Derecesi	Düşük	4/30	%13,3
	Orta	23/30	%76,67
	Yüksek	3/30	%10

Lenf Nodu Tutulumu	Yok	16/30	%53,3
	Var	14/30	%46,67
Nüks	Yok	25/30	%83,3
	Var	5/30	%16,67

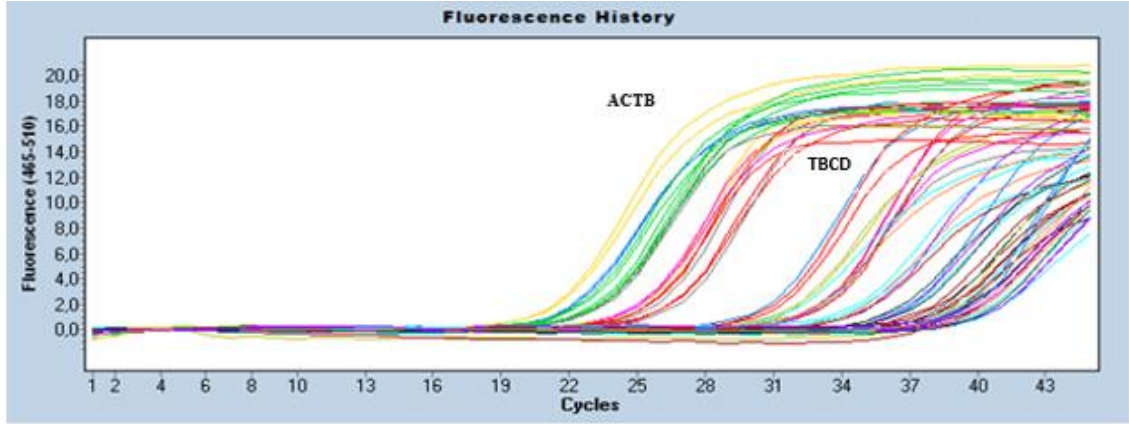
Tablo 4-3: Premalin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri

		N	(%)
Cinsiyet	Kadın	15/30	%50
	Erkek	15/30	%50
Yaş	≤50	17/30	%56,67
	>50	13/30	%43,3
Patoloji	Oral lökoplaki	7/30	(%23,3)
	Oral likenoid displazi	10/30	(%33,3)
	Liken planus	13/30	(%43,3)
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13/30	(43,3%)
	Var (+)	17/30	(56,6%)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	24/30	(80%)
	Var (+)	6/30	(20%)

4.2. TBCD Geninin Ekspresyon Analizinin Sonuçları

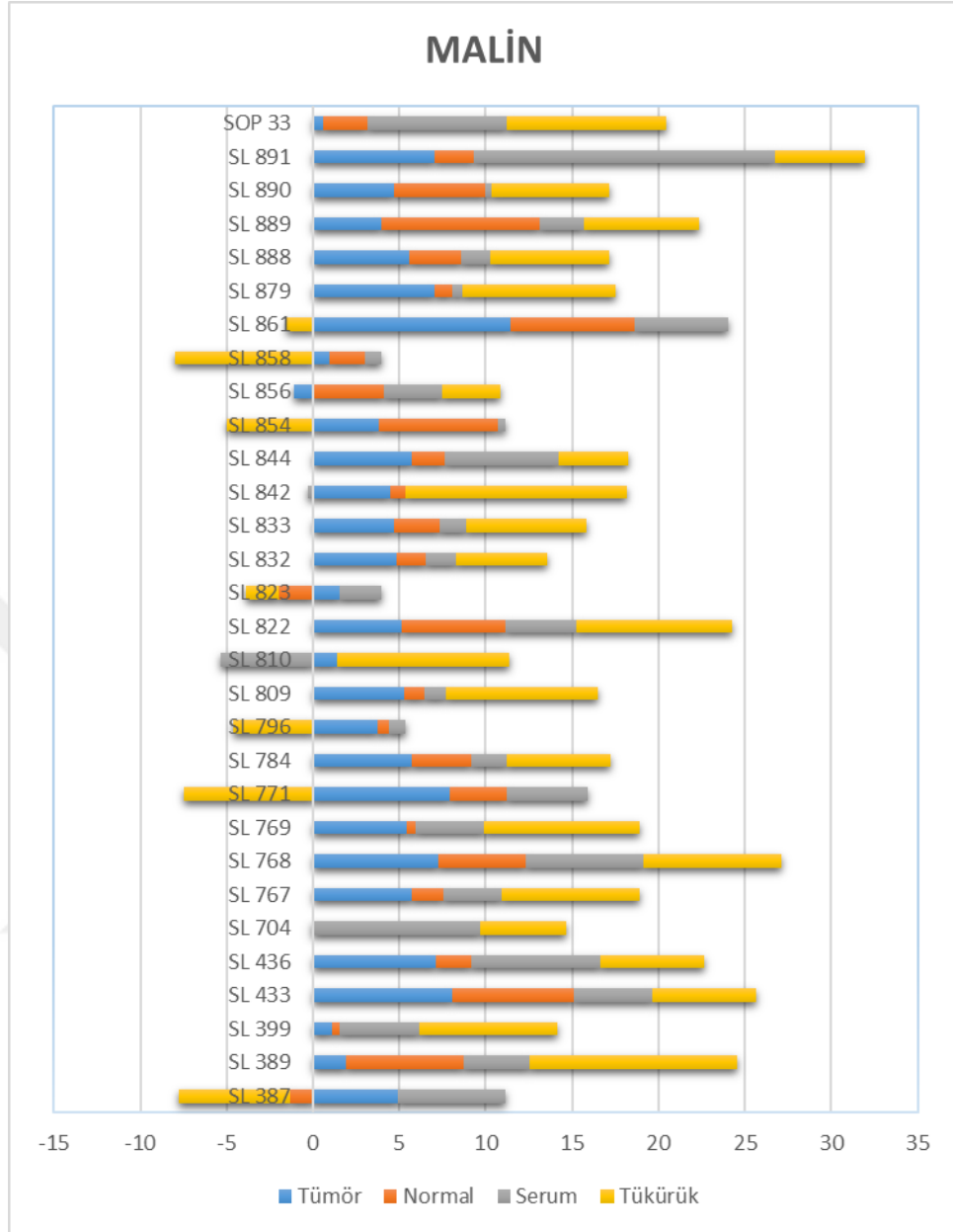
Çalışmamızda 30 OSCC ve 30 OPML tanısı alan hastalara ait tümör/eşlenik normal doku ile serum ve tükürük örnekleri ve 15 sağlıklı bireyin normal doku, serum ve tükürük örnekleri kullanılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylere ait örneklerin ekspresyon seviyeleri, SYBR Green içeren reaksiyon karışımı ile Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR) tekniği kullanılarak incelendi. Hedef gen (*TBCD*) ve referans genin (*ACTB*) ekspresyon sonuçlarından elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{\Delta Ct}$ değerleri tüm örnekler için normalize edildikten sonra elde edilen sonuçların analizi LightCycler 480 yazılımındaki Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile yapılmış ve tümör dokusunun $2^{\Delta Ct}$ değerlerinin normal dokunun $2^{\Delta Ct}$ değerlerine göre kat değişimleri (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile

hesaplanmıştır. Buna göre 2'nin üzerinde olan değerler tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon artışı, 2'nin altındaki değerler ise ekspresyon azalışı olarak değerlendirilmiştir.

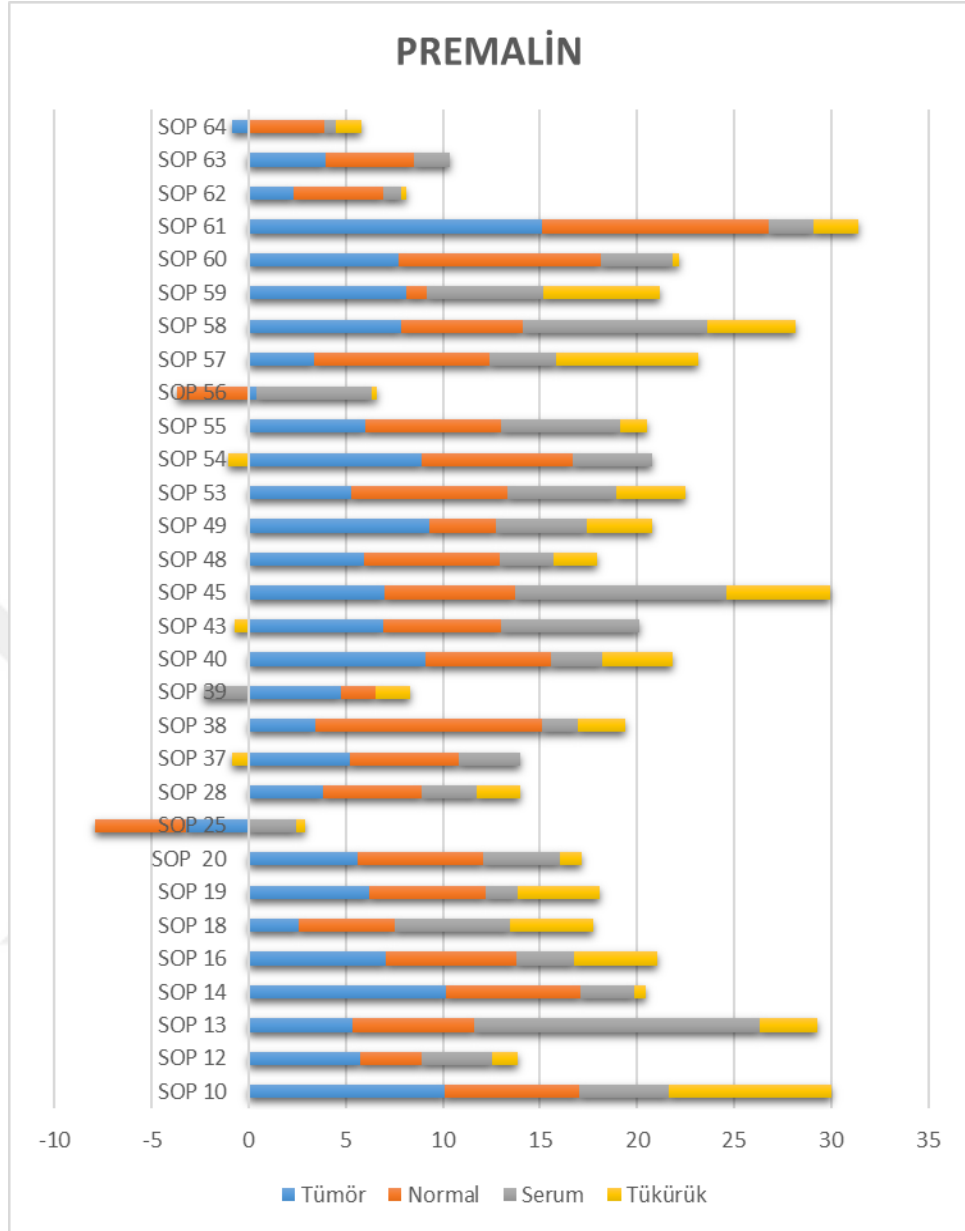


Şekil 4-1: Hastalara ait örneklerin hedef gen (*TBCD*) ve referans gendeki (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri

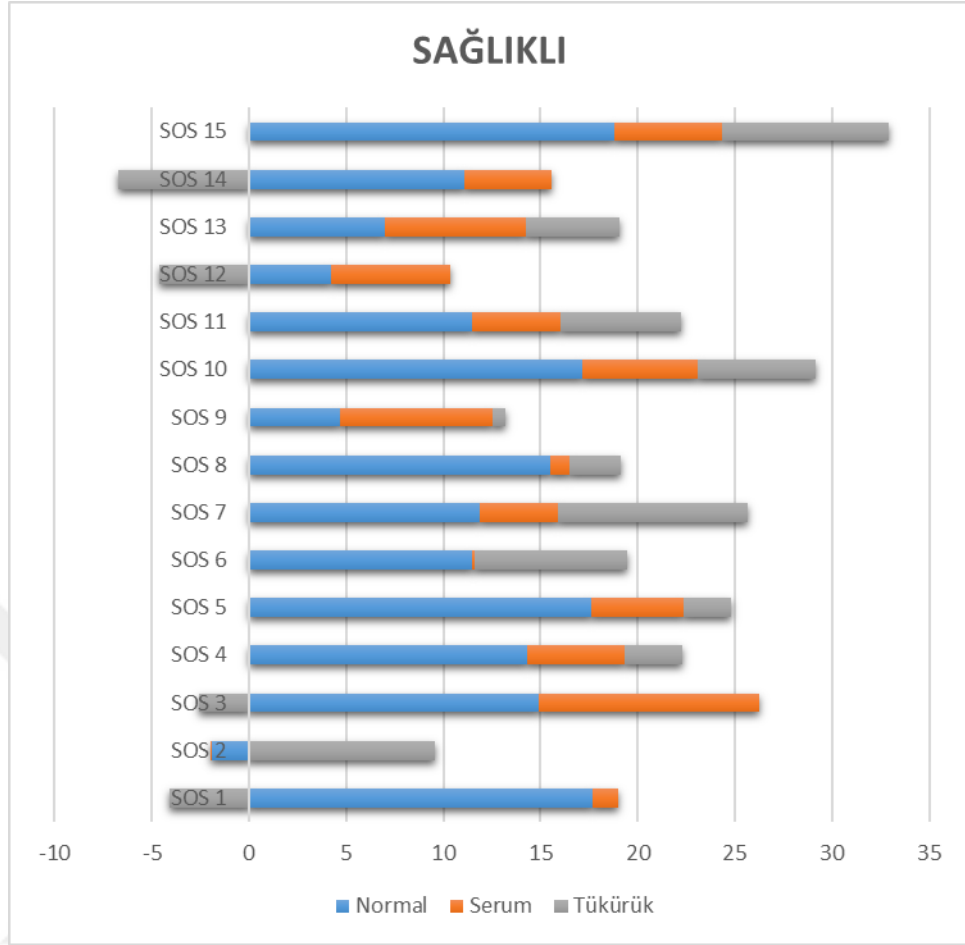
TBCD geninin ekspresyon seviyeleri referans genin OSCC ve OPML hastalarının tümör-eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerindeki ekspresyon seviyeleri ile sağlıklı bireylere ait normal mukoza, serum ve tükürük örneklerindeki ekspresyon seviyeleri $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı.



Şekil 4-2: OSCC hastalarına ait tümör-eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (Mavi: Tümör Doku Örneklerinin ΔC_t değerleri, Turuncu: Eşlenik Normal Doku Örneklerinin ΔC_t değerleri, Gri: Serum örneklerinin ΔC_t değerleri Sarı: Tükürük örneklerinin ΔC_t değerleri)

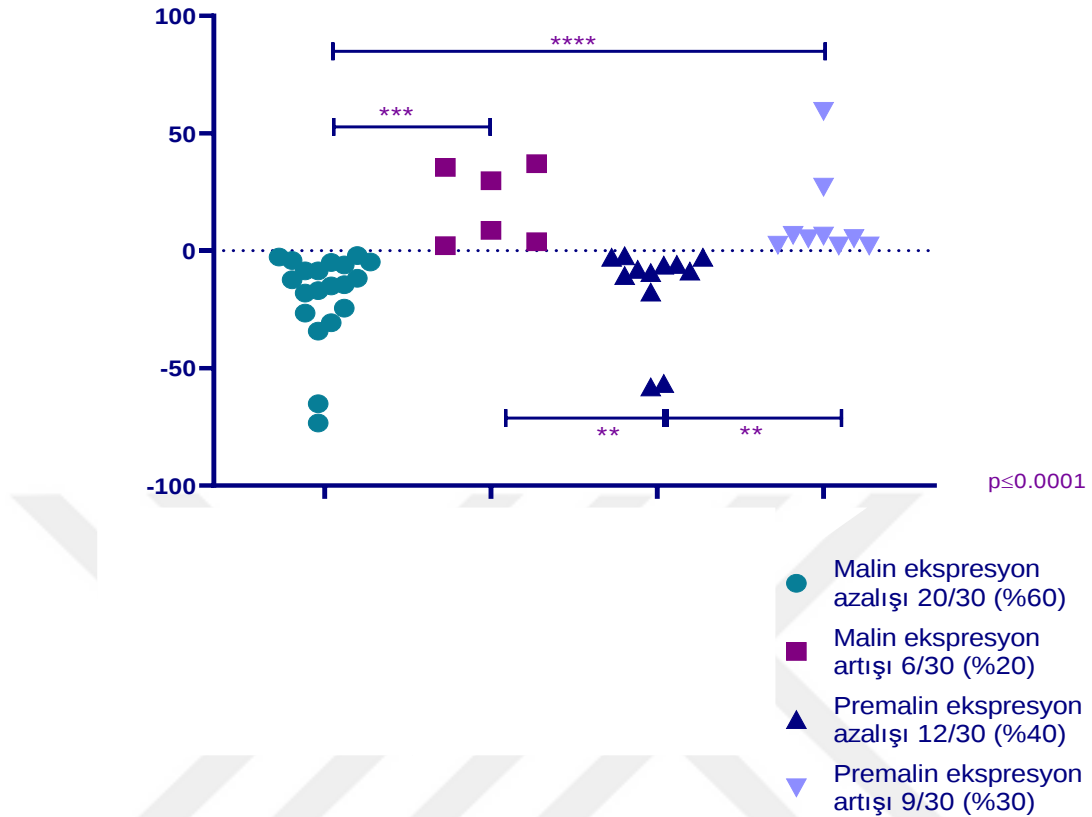


Şekil 4-3: OPML hastalarına ait tümör-eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (Mavi: Tümör Doku Örneklerinin ΔC_t değerleri, Turuncu: Eşlenik Normal Doku Örneklerinin ΔC_t değerleri, Gri: Serum örneklerinin ΔC_t değerleri, Sarı: Tükürük örneklerinin ΔC_t değerleri)



Şekil 4-4: Sağlıklı mukoza, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (Mavi: Mukoza Örneklerinin ΔC_t değerleri, Turuncu: Serum Örneklerinin ΔC_t değerleri, Gri: Tükürük örneklerinin ΔC_t değerleri)

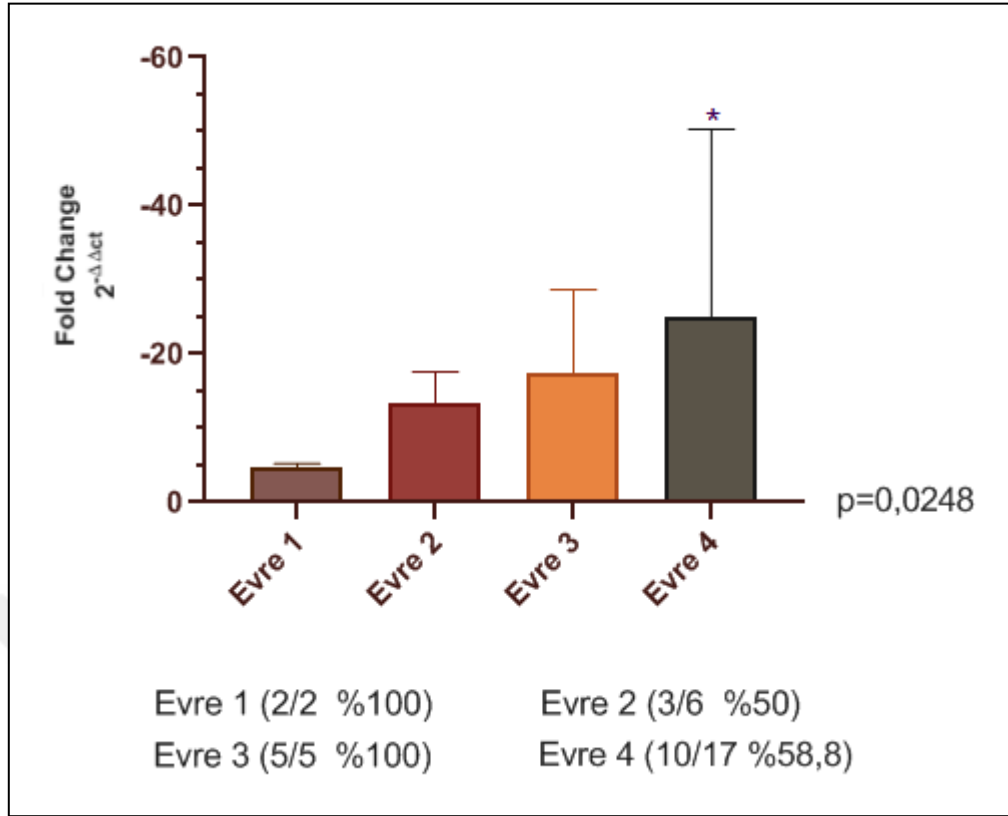
OPML ve OSCC hastalarına ait tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon azalışı veya artışı ile hastalara ait klinikopatolojik bilgilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması IBM SPSS Statistics 20 programı yardımıyla gerçekleştirildi.



Şekil 4-5: OSCC ve OPML hastalarına ait dokularda relatif olarak hesaplanan ekspresyon düzeylerine ait artma ve azalma sayılarının gösterimi ($p < 0.0001$)

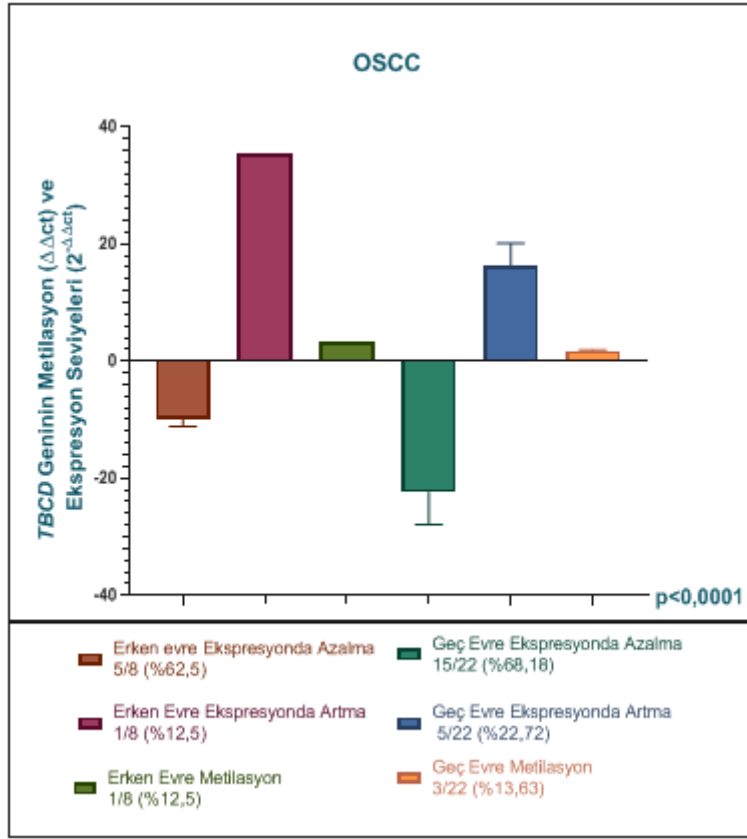
*Gruplar arası anlamlılık

TBCD geninin ekspresyon düzeyi ve referans gen olan *ACTB*, OSCC ve OPML hastalarına ait tümör (T) ve eşlenik normal (N) doku örneklerindeki ekspresyon düzeylerindeki artma ve azalma $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile relatif olarak hesaplandı. OSCC hastalarının %60'ında (20/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma ve %20'sinde (6/30) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, 4 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi. OPML hastaların %40'ında (12/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma ve %30'unda (9/30) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken 9 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4-5).



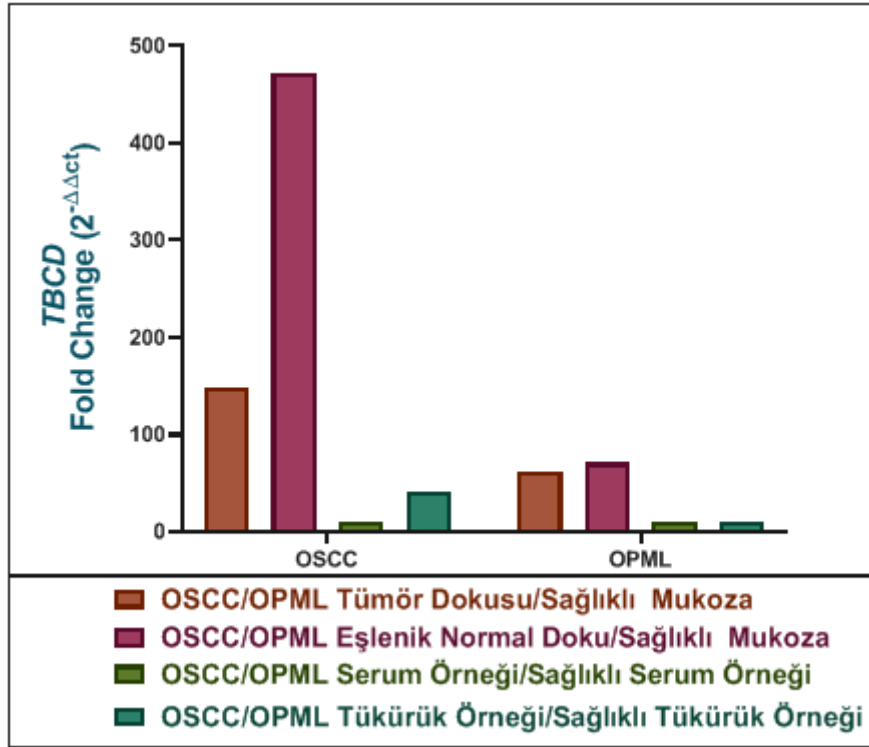
Şekil 4-6: Malin hasta grubunda evrelere göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyinde meydana gelen azalma ($p=0,0248$)

Şekil 4-6'da malin hasta grubunda evrelere göre *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinde azalış görülen hasta sayıları gösterilmiştir ($p=0,0248$). Evre I olan 2 hastanın 2'sinde (%100) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Evre II olan 6 hastanın 3'ünde (%50) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiş, evre III olan 5 hastanın 5'inde (%100) ekspresyonda azalma ve evre IV olan 17 hastanın 10'unda (%58,8) ekspresyonda azalma gözlenmiştir. Malin hasta grubunda evrelere göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0248$).



Şekil 4-7: Malin hasta grubunda erken evre (I-II) ve geç evreye (III-IV) göre TBCD geninin ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimler ($p < 0,0001$)

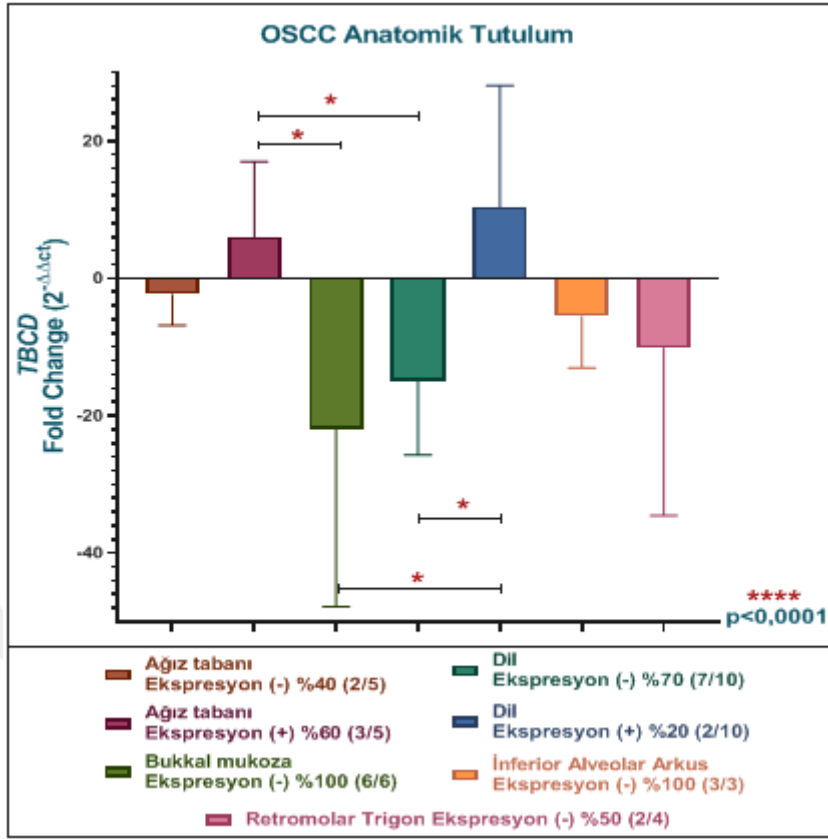
Şekil 4-7’de malin hasta grubunda erken evre (I-II) ve geç evreye (III-IV) göre TBCD geninin ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir ($p < 0,0001$). Erken evrede meydana gelen tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyonda azalma, erken evrede meydana gelen ekspresyon artışına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$). Erken evre hastalarında meydana gelen metilasyona bağlı ekspresyonda azalma ($p < 0,0046$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Geç evrede meydana gelen ekspresyonda azalma, geç evrede meydana gelen ekspresyon artışına kıyasla ($p < 0,0001$) ve geç evre hastalarında meydana gelen metilasyon ile erken evre hastalarında meydana gelen ekspresyon artışı arasında ($p < 0,0009$) istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir.



Şekil 4-8: OSCC/OPML hasta gruplarının tümör, eşlenik normal dokuları ile serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylerin mukoza, serum ve tükürük örneklerinin ortalama ΔCt değerleri ile $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesabının gösterimi

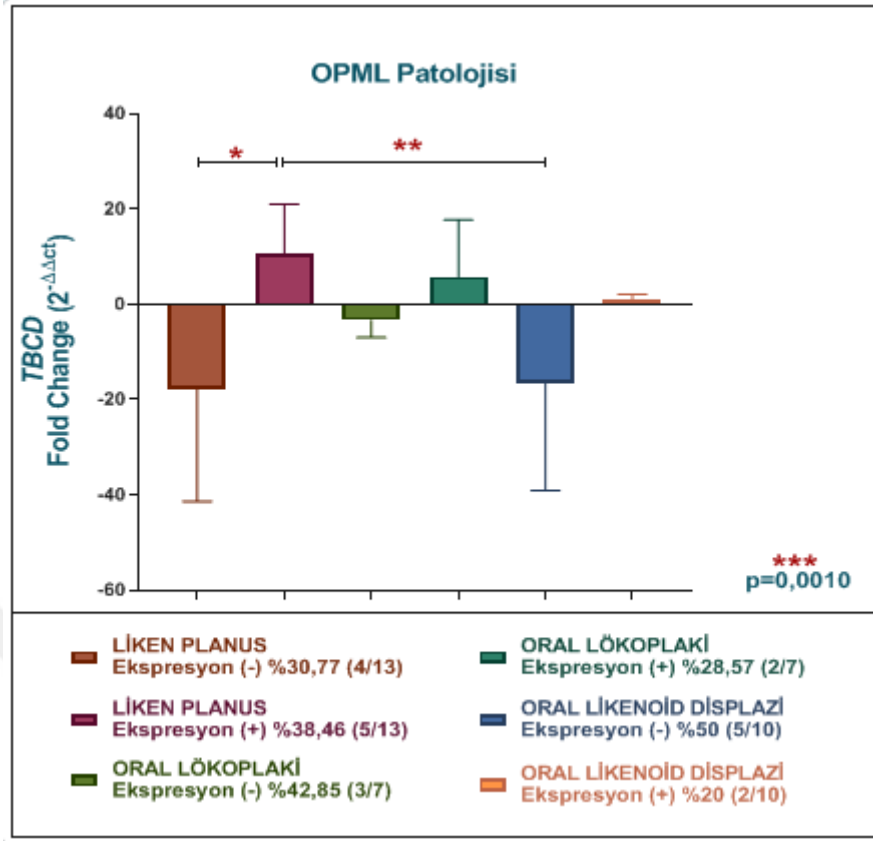
OSCC hastaların tümör dokularına ait Ct değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait Ct değerlerinin ortalamaları kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı. Hastalarda, sağlıklı bireylere kıyasla *TBCD* geninde 147 kat ekspresyon seviyesinde değişim gözlenmiştir. OSCC hasta grubunun eşlenik normal dokularında sağlıklı mukozaya göre 472 kat, OSCC grubuna ait serum örneklerinde sağlıklı serum örneklerine göre 1,87 kat, OSCC grubuna ait tükürük örneklerinde sağlıklı tükürük örneklerine göre 41 kat ekspresyon seviyelerinde değişim gözlenmiştir.

OPML hastaların tümör dokularına ait Ct değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait Ct değerlerinin ortalamaları kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı. Hastalarda, sağlıklı bireylere kıyasla *TBCD* geninde 62 kat ekspresyon seviyesinde değişim gözlenmiştir. OPML hastalarının eşlenik normal dokularında sağlıklı mukozaya göre 71 kat değişim gözlenirken, OPML hastalarının serum örneklerinde sağlıklı serum örneklerine göre ve OPML hastalarına ait tükürük örneklerinde sağlıklı tükürük örneklerine göre ekspresyon seviyesinde değişimlerinde anlamlı fark gözlenmemiştir gözlenmiştir (Şekil 4-8).



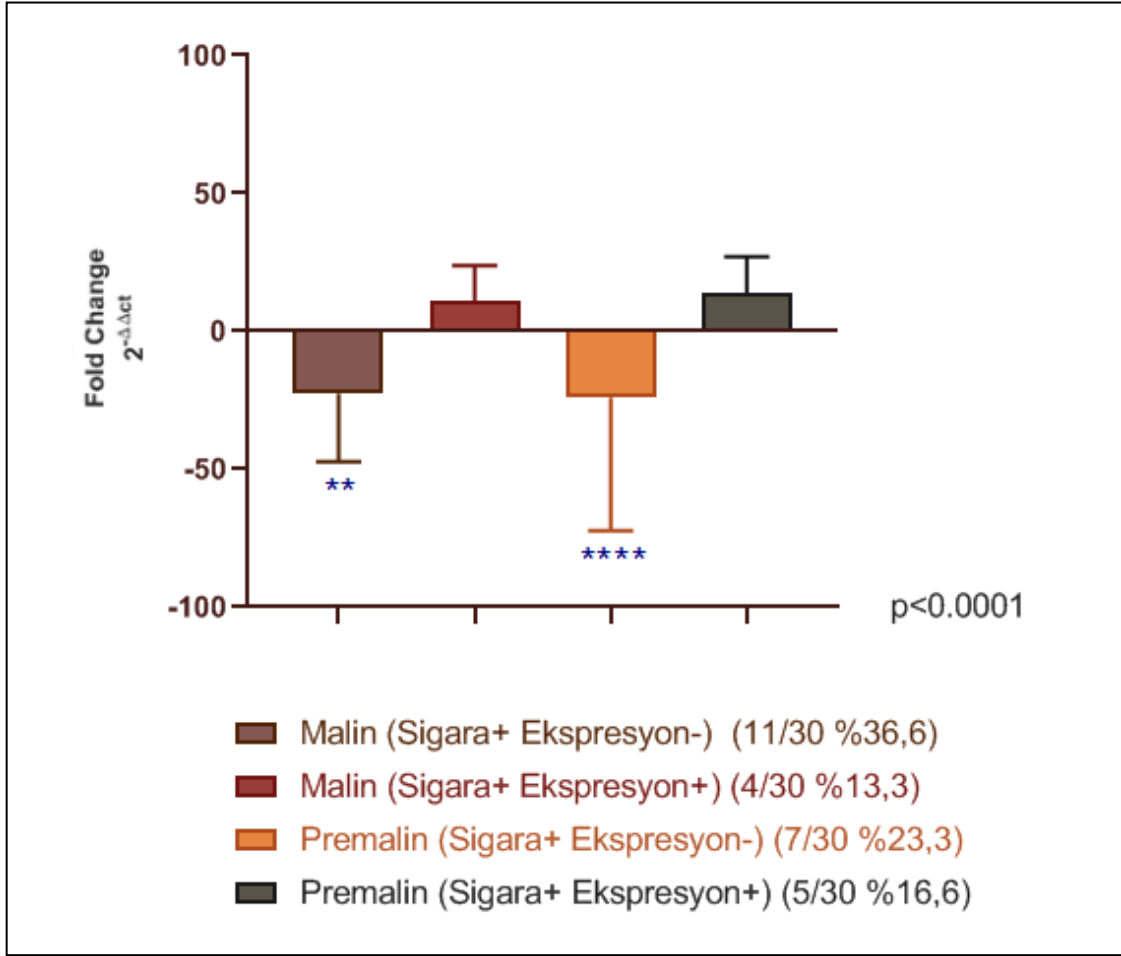
Şekil 4-9: Malin hasta grubunda anatomik tutulumu göre TBCD geninin ekspresyon düzeyindeki değişim seviyeleri ($p < 0,0001$) *Gruplar arası anlamlılık

Şekil 4-9'da malin hasta grubunda anatomik tutulumu göre ekspresyon seviyesindeki değişim düzeyleri gösterilmiştir ($p < 0,0001$). Ağız tabanı tümörüne sahip 5 hastanın 2'sinde (%40) ekspresyonda azalma ve 3'ünde (%60) ekspresyonda artma gözlenmiştir. Dil bölgesinde anatomik tutulum gösteren 10 hastanın 7'sinde (%70) ekspresyonda azalma ve 2'sinde (%20) ekspresyonda artma gözlenmiştir. Bukkal mukoza bölgesinde anatomik tutulum gösteren 6 hastanın tamamında (%100) ve inferior alveolar arkus bölgesinde anatomik tutulum gösteren 3 hastanın tamamında (%100) ekspresyonda azalma gözlenirken; retromolar trigon bölgesinde anatomik tutulum gösteren 4 hastanın 2'sinde (%50) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca yine bukkal mukoza ve inferior alveolar arkus tanımlı OSCC hastaları incelendiğinde sırasıyla 6 hastadan 4'ünün (%66,6) ve 3 hastadan 2'sinin (%66,6) ileri evre (evre III ve evre IV) hastası olduğu saptandı.



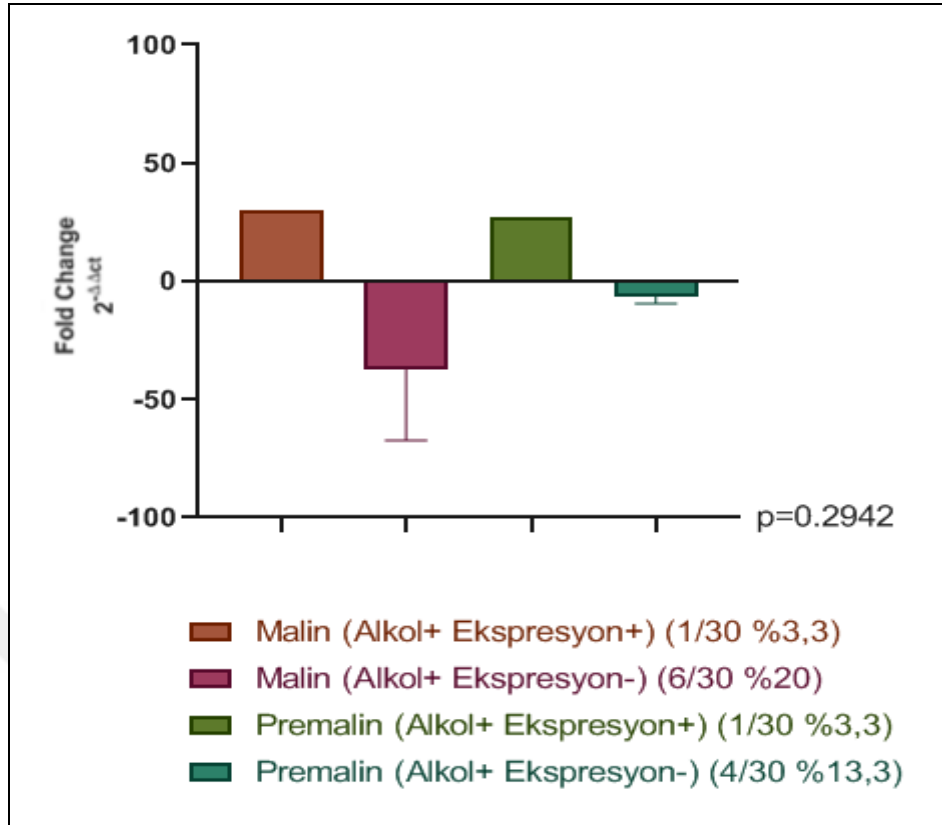
Şekil 4-10: Premalin hasta grubu patolojilerine göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyindeki değişim seviyeleri (p=0,0010)

Şekil 4-10’da premalin hasta grubunda gözlenen patolojilere göre ekspresyon düzeyindeki değişim seviyeleri gösterilmektedir. Liken planus patolojisi gösteren 13 hastanın 4’ünde (%30,77) ekspresyon seviyesinde azalma, 5’inde (%38,46) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlendi. Oral lökoplaki patolojisi gösteren 7 hastanın 3’ünde (%42,85) ekspresyon seviyesinde azalma, 2’sinde (%28,57) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlendi. Oral likenoid displazi patolojisi gösteren 10 hastanın 5’inde (%50) ekspresyon seviyesinde azalma ve 2’sinde (%20) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlendi. Premalin hasta grubu patolojilerine göre *TBCD* geninin ekspresyon düzeyindeki değişim seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,0010).



Şekil 4-11: Malin ve premalin hasta grubunda sigara tüketimine göre ekspresyon değerlerindeki değişim (p<0.0001)

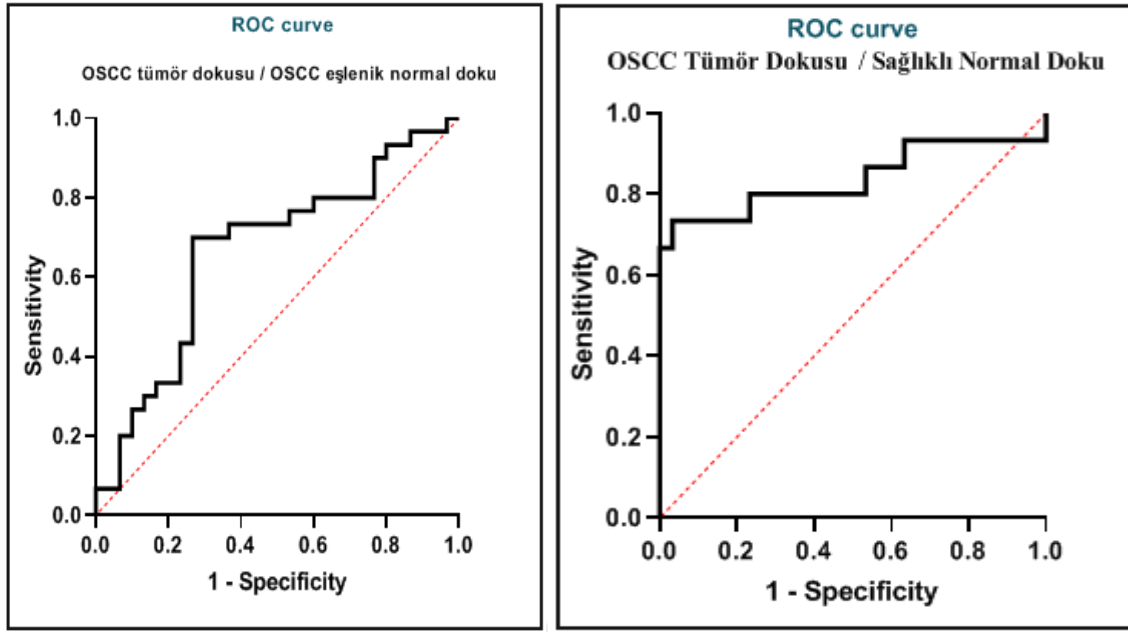
Şekil 4-11’de malin ve premalin hasta grubunda sigara tüketimine göre *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinde artış ve azalış görülen hasta sayıları gösterilmiştir (p<0.0001). Malin hasta grubunda 30 hastadan 11’inde (%36,6) ekspresyon seviyesinde azalma ve 4’ünde (%13,3) ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir. Premalin hasta grubunda ise 30 hastadan 7’sinde (%23,3) ekspresyon seviyesinde azalma ve 5’inde (%16,6) ekspresyon seviyesinde artış gözlenmiştir. Malin ve premalin hasta grubunda sigara tüketimi ile tümör dokusunda normal dokuya oranla ekspresyon azalışı arasında istatistiksel olarak (sırasıyla p=0,0022, p<0,0001) anlamlılık gözlenmiştir.



Şekil 4-12: Malin ve premalin hasta grubunda alkol tüketimine göre ekspresyon değerlerindeki değişim (p=0.2942)

Şekil 4-12’de malin ve premalin hasta grubunda alkol tüketimine göre *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinde artış ve azalış görülen hasta sayıları gösterilmiştir (p=0.2942). Malin hasta grubunda 30 hastadan 1’inde (%3,3) ekspresyon seviyesinde artış ve 6’sında (%20) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Premalin hasta grubunda ise 30 hastadan 1’inde (%3,3) ekspresyon seviyesinde artış ve 4’ünde (%13,3) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiştir. Malin ve premalin hasta grubunda alkol tüketimine göre ekspresyon azalışı ve artışı arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmemiştir.

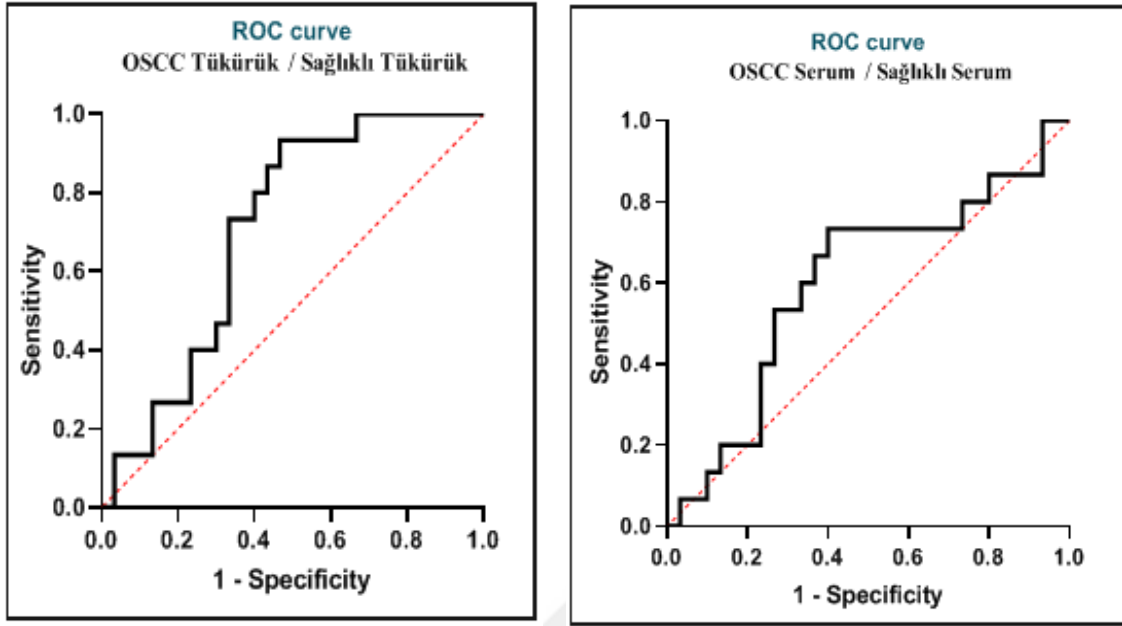
Tablo 4-4 ve Tablo 4-5’te standart curve eğrisi koordinatları, duyarlılık ve ekspresyon değerlerinin denk geldiği eşik değerleri (cut-off points) belirtilmiştir.



Şekil 4-13: (A) Malin grupta tümör ile eşlenik normal dokularında *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

(B) Malin grupta tümör ile sağlıklı normal dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi

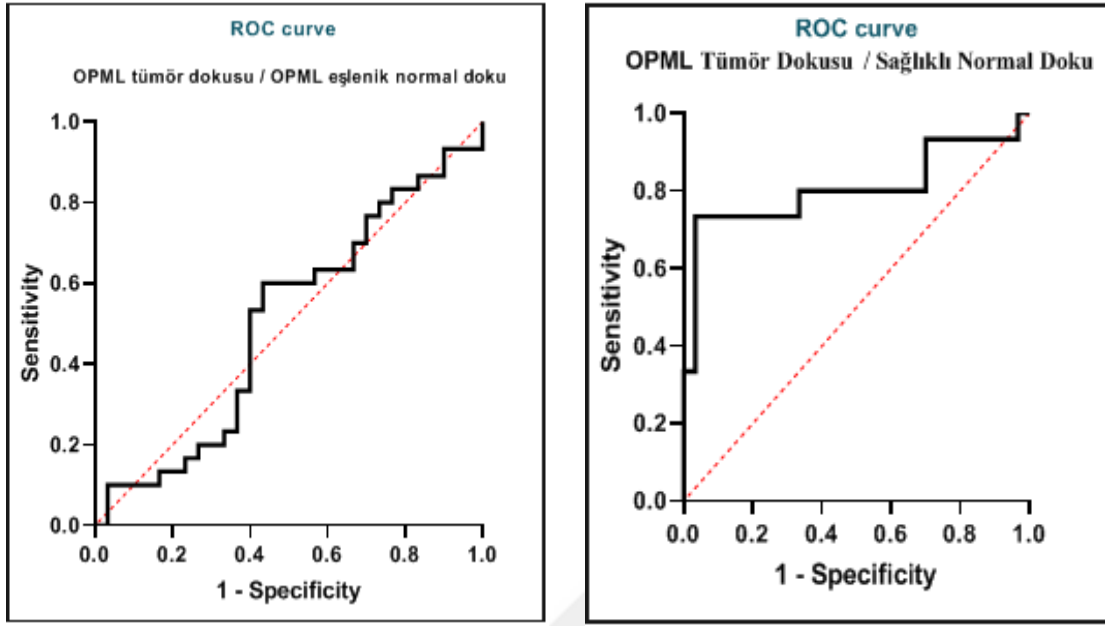
OSCC hasta grubunda tümör ile eşlenik normal dokularda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %60 duyarlılık %60 özgüllük ile duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-13 (A)). Tablo 4-4'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 4,5 olarak belirlenebilir. OSCC hasta grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %25 duyarlılık ve %65,4 özgüllük ile duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-12 (B)). Tablo 4-4'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 4,5 olarak belirlenebilir.



Şekil 4-14: (A) Malin grupta tükürük ile sağlıklı tükürükte *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grupta serum ile sağlıklı serumda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OSCC hasta grubunda tükürük örnekleri ile sağlıklı grubun tükürük örneklerinde *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %50 duyarlılık %34,6 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-14 (A)). Tablo 4-5'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 4,5 olarak belirlenebilir.

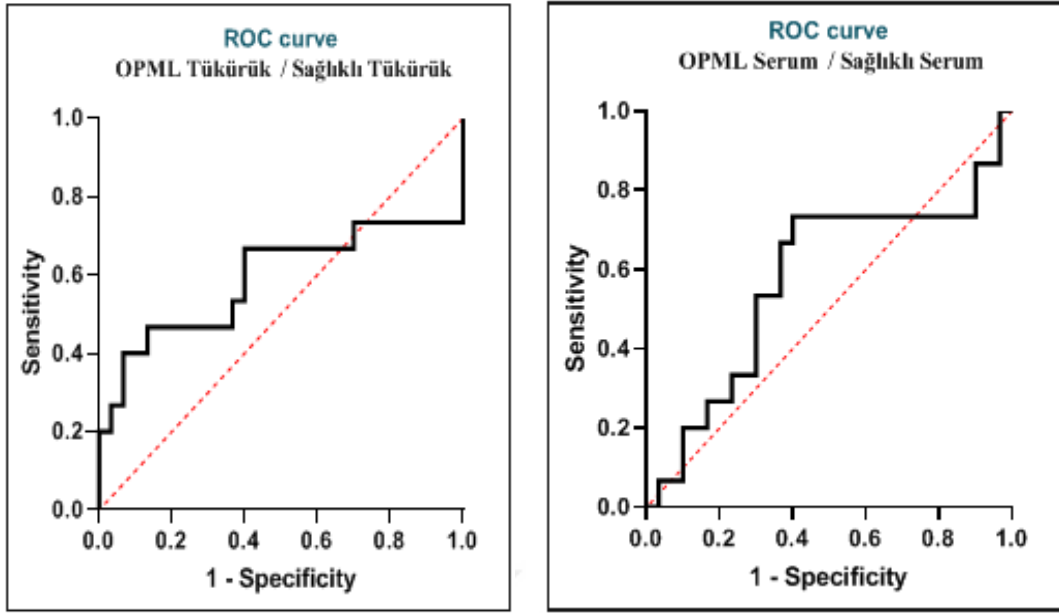
OSCC hasta grubunda serum örnekleri ile sağlıklı grubun serum örneklerinde *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %50 duyarlılık %50 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-13 (B)). Tablo 4-5'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 5,5 olarak belirlenebilir.



Şekil 4-15: (A) Premalin grupta tümör ile eşlenik normal dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Premalin grupta tümör ile sağlıklı normal dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OPML hasta grubunda tümör ile eşlenik normal dokularda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %100 duyarlılık %27,6 özgüllük ile özgüllüğü düşük ve duyarlılığı yüksek bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-15 (A)). Tablo 4-4'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 7,5 olarak belirlenebilir.

OPML hasta grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %75 duyarlılık %53,8 özgüllük ile özgüllüğü düşük ve duyarlılığı yüksek bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-14 (B)). Tablo 4-4'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 5,5 olarak belirlenebilir.



Şekil 4-16: (A) Premalin grupta tükürük ile sağlıklı tükürükte *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Premalin grupta serum ile sağlıklı serumda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

OPML hasta grubunda tükürük örnekleri ile sağlıklı grubun tükürük örneklerinde *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %50 duyarlılık %46,2 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-16 (A)). Tablo 4-5'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 3,5 olarak belirlenebilir

OPML hasta grubunda serum örnekleri ile sağlıklı grubun serum örneklerinde *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %50 duyarlılık %39,3 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir (Şekil 4-15 (B)). Tablo 4-5'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 2,5 olarak belirlenebilir.

Tablo 4-4: OSCC (n=20) ve OPML (n=12) gruplarındaki tümör-eşlenik normal-sağlıklı dokularda *TBCD* geninin azalan ekspresyon seviyelerinin özgüllük ve duyarlılık değerleri

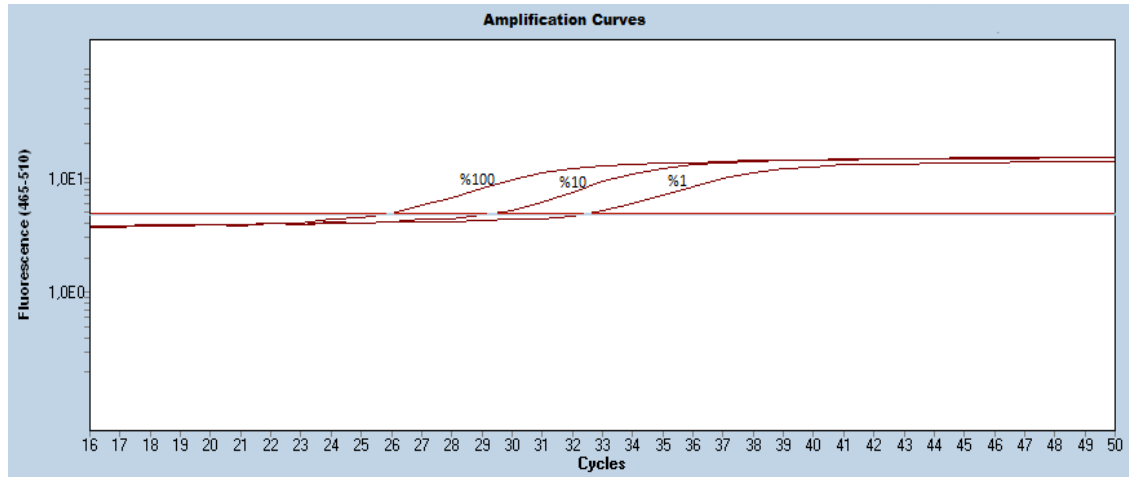
	Tümör Dokusu / Eşlenik Normal Doku			Tümör Dokusu / Sağlıklı Normal Doku		
	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük
OSCC	4,50	60	60	4,50	25	65,4
OPML	7,50	100	27,6	5,50	75	53,8

Tablo 4-5: OSCC ve OPML gruplarındaki serum-tükürük örneklerinde TBCD geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri

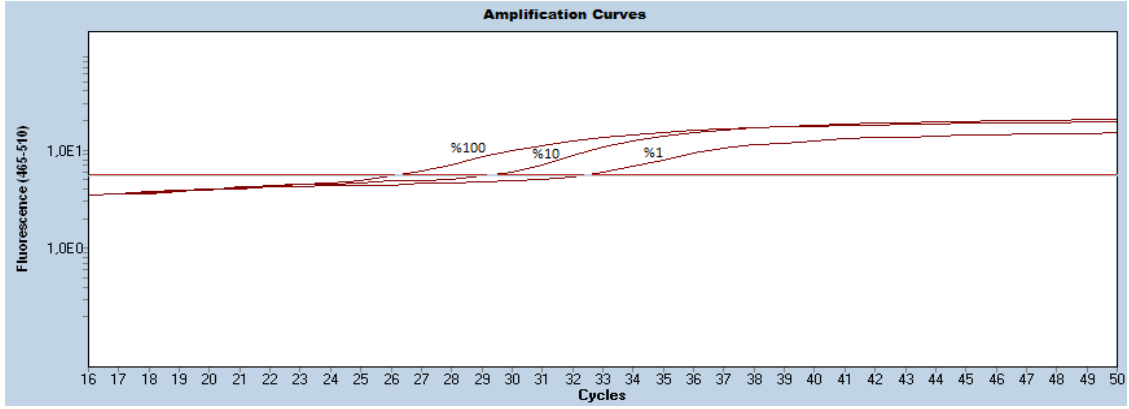
	Serum / Sağlıklı Serum			Tükürük / Sağlıklı Tükürük		
	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgüllük
OSCC	5,5	50	50	4,5	50	34,6
OPML	2,5	50	39,3	3,5	50	46,2

4.3. TBCD Geninin Metilasyon Analizinin Sonuçları

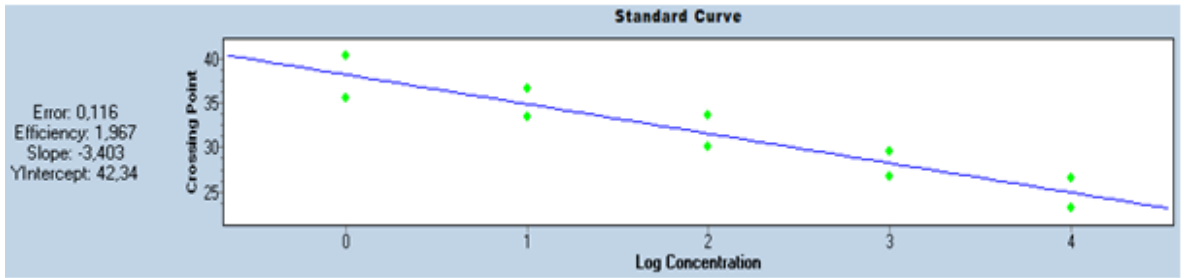
Çalışmamızda OSCC tanısı alan 30 hasta ve OPML tanısı alan 30 hastanın tümör ve eşlenik normal doku örnekleri ile kendisinde ve ailesinde malin/benin tümör öyküsü mevcut olmayan 15 sağlıklı bireyin normal mukoza örneklerinin metilasyon durumu Kantitatif Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (QMSP) ile incelendi. Kantitatif ölçüm yapılabilmesi için, %100 metillenmiş standart ve bu standarttan elde ettiğimiz dilüsyonlar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) kullanılmıştır. Elde edilen metilasyon verilerinin analizi, LightCycler 480 yazılımıyla (Absolüt Hesaplama/Fit Points programı) gerçekleştirilmiştir. Hedef genin (TBCD) amplifikasyon eğrileri Şekil 4-17’de ve referans genin (ACTB) amplifikasyon eğrileri Şekil 4-18’de, standart curve eğrisi ise Şekil 4-19’de gösterilmiştir.



Şekil 4-17: Hedef genin (TBCD) amplifikasyon eğrileri

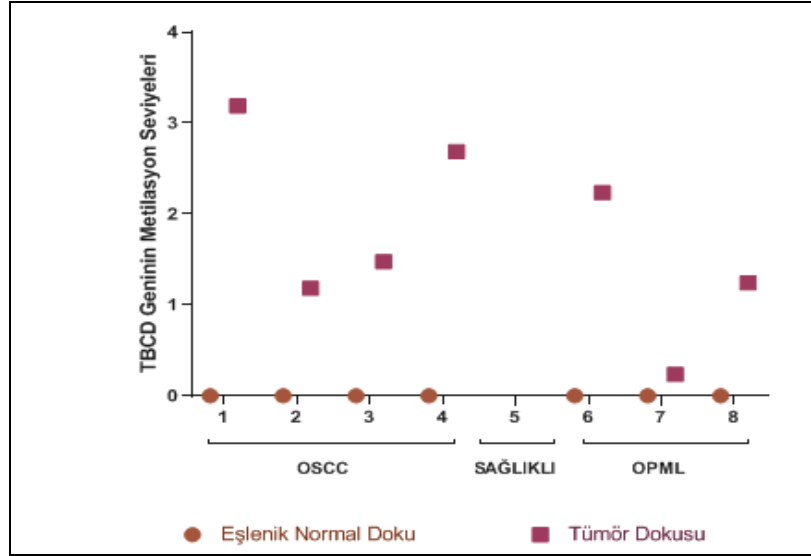


Şekil 4-18: Referans genin (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri



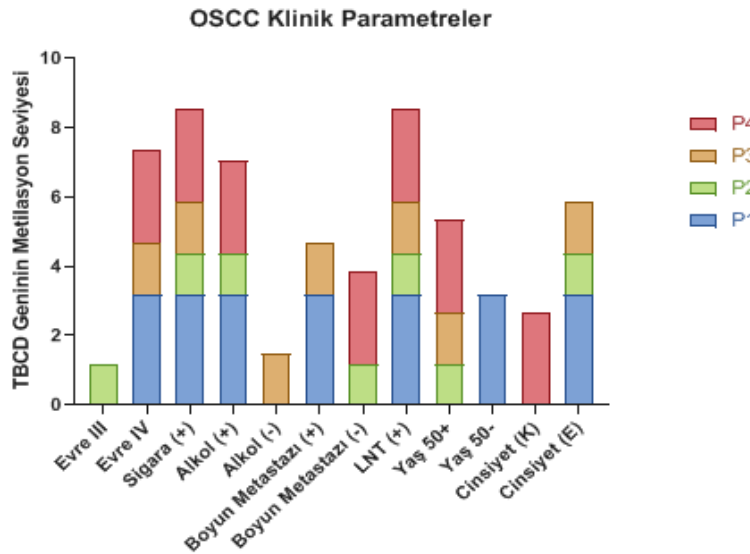
Şekil 4-19: Standart curve eğrisi

Şekil 4-20’de OSCC ve OPML hastalarına ait tümör-eşlenik normal doku ve sağlıklı dokuda *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında gözlenen metilasyon seviyeleri gösterilmiştir.



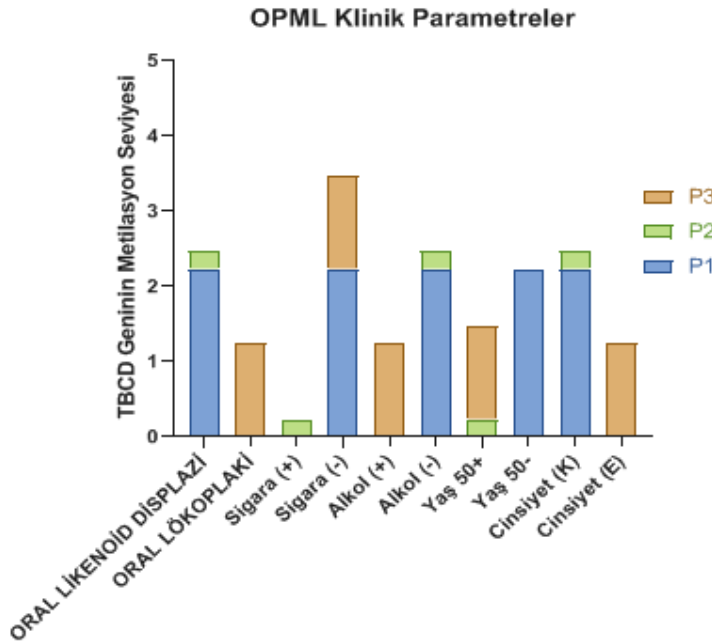
Şekil 4-20: OSCC ve OPML hastalarına ait tümör ve eşlenik normal doku ve sağlıklı dokuda *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında gözlenen metilasyon seviyeleri

OSCC hastalarına ait tümör dokusu örneklerinde *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon oranı %13,3 (4/30) iken, normal doku örneklerinde metilasyon gözlenmemiştir. OPML hastalarına ait tümör dokusu örneklerinde *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon oranı %10 (3/30) iken, normal doku örneklerinde metilasyon gözlenmemiştir (Şekil 4-20).



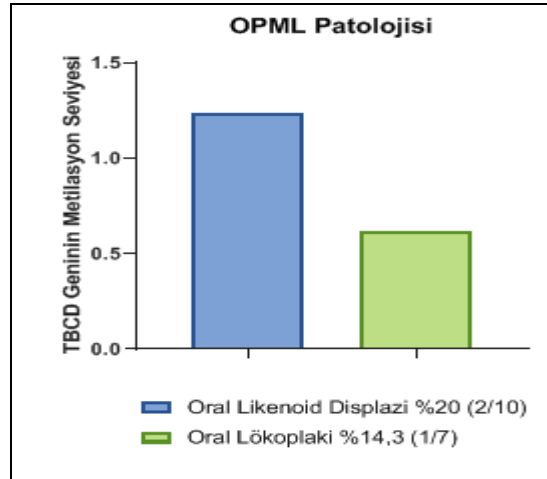
Şekil 4-21: *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlenen OSCC hastalarının klinik parametrelerinin gösterimi

Şekil 4-21’de *TBCD* geninin promoter bölgesinde CpG adacıklarında metilasyon gözlenen 4 adet OSCC hastasının klinik parametreleri gösterilmiştir. P1 kodlu hasta; metilasyon seviyesi 3,18 olan, evre IV, sigara ve alkol tüketimi mevcut, boyun metastazı ve lenf nodu tutulumu olan, 50 yaşından küçük, erkek hastadır. P2 kodlu hasta metilasyon seviyesi 1,18 olan, evre III, sigara ve alkol tüketimi mevcut, lenf nodu tutulumu olan ve boyun metastazı olmayan, 50 yaşından büyük erkek hastadır. P3 kodlu hasta metilasyon seviyesi 1,47 olan, evre IV, sigara tüketimi olup alkol tüketimi olmayan, boyun metastazı ve lenf nodu tutulumu mevcut, 50 yaşından büyük erkek hastadır. P4 kodlu hasta metilasyon seviyesi 2,68 olan, evre IV, sigara ve alkol tüketimi mevcut, lenf nodu tutulumu olan ve boyun metastazı olmayan, 50 yaşından büyük kadın hastadır.



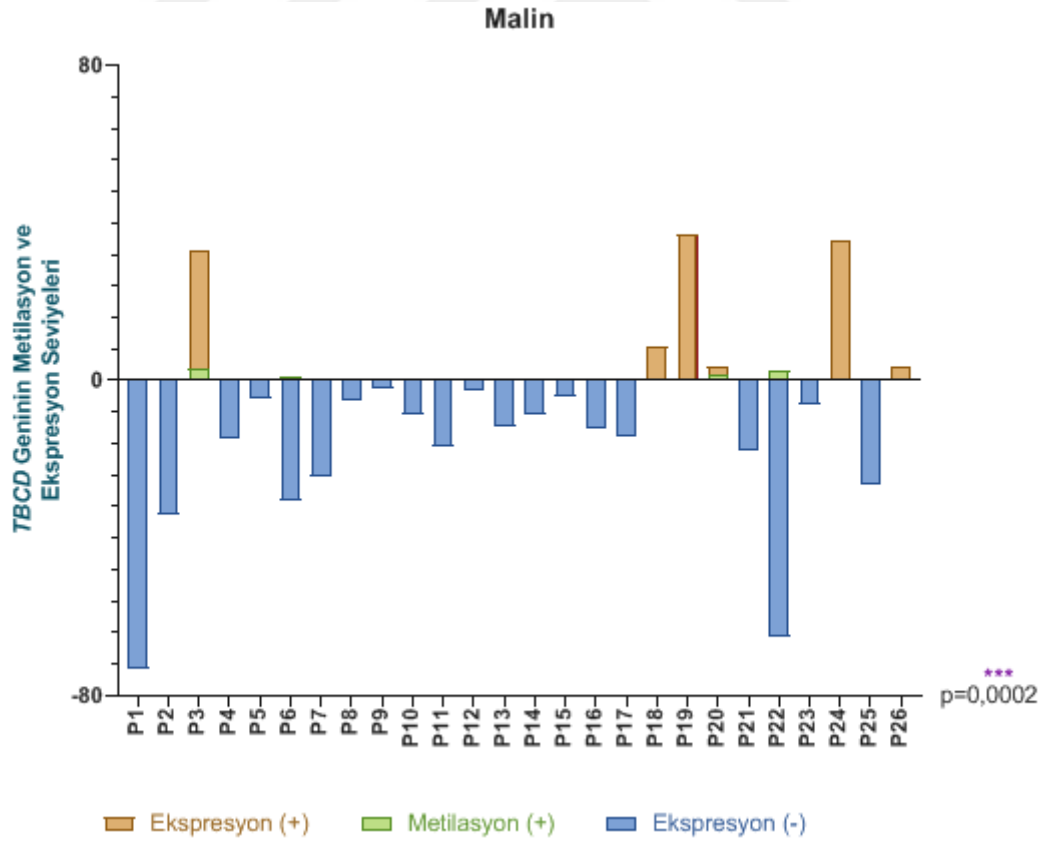
Şekil 4-22: *TBCD* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlenen OPML hastalarının klinik parametrelerinin gösterimi

Şekil 4-22’de *TBCD* geninin promoter bölgesinde CpG adacıklarında metilasyon gözlenen 3 adet OPML hastasının klinik parametreleri gösterilmiştir. P1 kodlu hasta metilasyon seviyesi 0,17 olan, oral likenoid displazi tanılı, sigara ve alkol tüketimi olmayan, 50 yaş altı kadın hastadır. P2 kodlu hasta oral likenoid displazi tanılı, sigara tüketimi olan ancak alkol tüketimi olmayan, 50 yaş üstü kadın hastadır. P3 kodlu hasta oral lökoplaki tanılı, sigara tüketimi olmayan ancak alkol tüketimi olan 50 yaş üstü erkek hastadır.



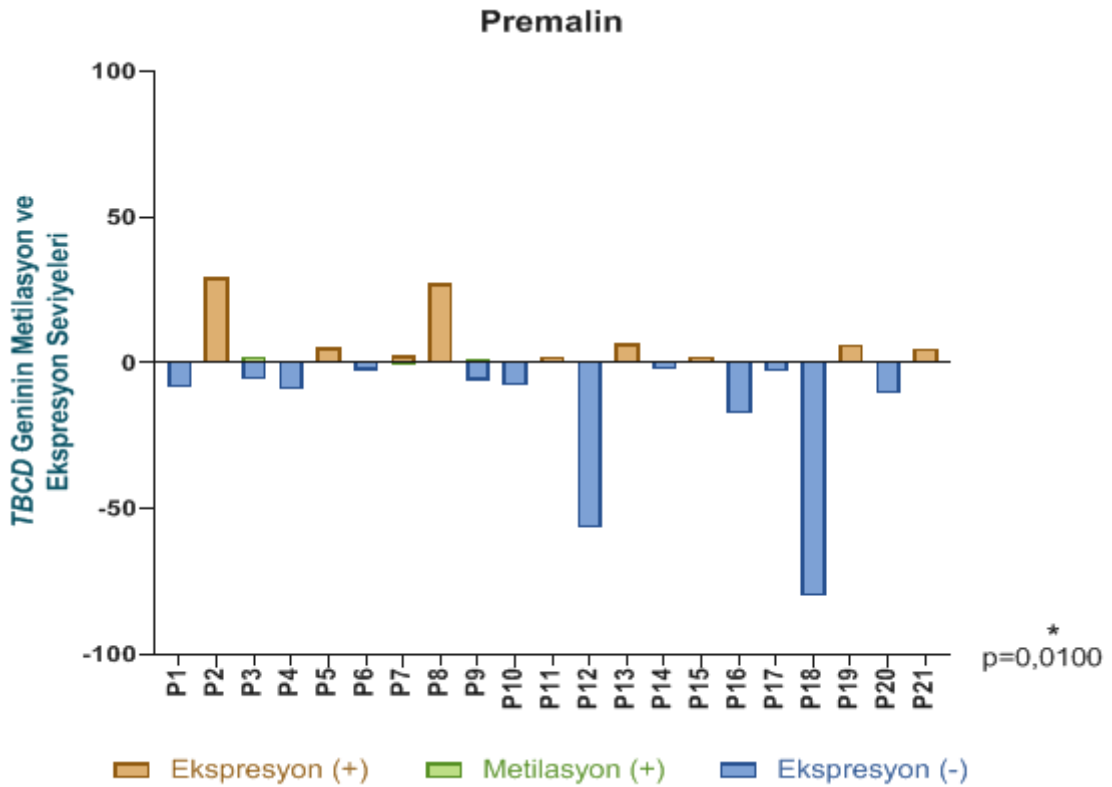
Şekil 4-23: TBCD geninin promoter bölgesinde CpG adacıklarında metilasyon gözlenen OPML hastalarına ait patolojinin gösterimi

Oral likenoid displazi patolojisi gözlenen 10 hastadan 2'sinde (%20) ve oral lökoplaki patolojisi gözlenen 7 hastadan 1'inde (14,3) TBCD geninin promoter bölgesinde metilasyon varlığı saptanmıştır.



Şekil 4-24: Malin grupta TBCD geninin ekspresyon ve promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin one-way Anova analizi ile gösterimi (p=0,0002)

Malin hasta grubunda 30 hastadan 20'sinde tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma ve 6'sında ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken 4 hastada herhangi bir değişim gözlenmemiştir. *TBCD* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenen 4 hastanın 2'sinde ise metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir. 1 hastada ekspresyon seviyesinde artış meydana gelirken, 1 hastada herhangi bir değişim gözlenmemiştir ($p=0,0002$). Tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastaların eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinde metilasyon varlığı saptanmamıştır. Malin hasta grubunda metilasyon gözlenen hastalar ile ekspresyonda azalma gözlenen hastalar arasında one-way Anova/ Friedman Test analizine göre istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ($p=0,0048$). Malin tümör dokusunda eşlenik normal dokuya kıyasla *TBCD* geninin ekspresyon seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$).



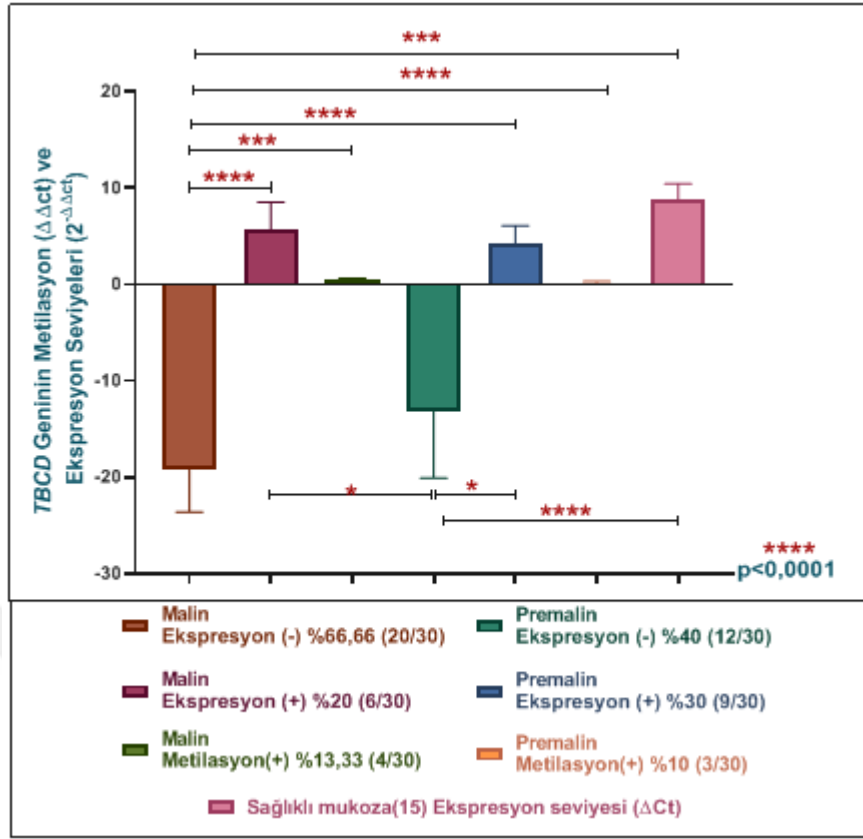
Şekil 4-25: Premalin grupta *TBCD* geninin ekspresyon ve promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin one-way Anova analizi ile gösterimi ($p=0,0100$)

Premalin hasta grubunda 30 hastadan 12'sinde tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma ve 9'unda ekspresyon seviyesinde artma

gözlenirken 9 hastada herhangi bir değişim gözlenmemiştir. *TBCD* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenen 3 hastanın 2'sinde ise metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma ve 1 hastada ekspresyon seviyesinde artış meydana geldiği gözlenmiştir ($p=0,01$). Tümör dokusunda metilasyon gözlenen 3 hastanın eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinde metilasyon varlığı saptanmamıştır. Premalin hasta grubunda yapılan one-way Anova/Friedman test analizine göre; metilasyon gözlenen hastalar ile ekspresyonda azalma gözlenen hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p=0,0173$). Aynı zamanda premalin dokuda eşlenik normal dokuya kıyasla *TBCD* geninin ekspresyon seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p= 0,0004$).

4.4. Ekspresyon ve Metilasyon Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi

QMSP sonucu OSCC hasta grubunda *TBCD* geninde metilasyon gözlenen 4 hasta ve OPML hasta grubunda *TBCD* geninde metilasyon gözlenen 3 hasta incelendi. OSCC hasta grubunda tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre metilasyon gözlenen 4 hastanın 2'sinde metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlendi. OPML hasta grubunda ise tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre metilasyon gözlenen 3 hastanın 2'sinde ekspresyon seviyesinde azalma belirlendi. Şekil 4-25'te OSCC ve OPML hasta gruplarında metilasyon ve ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin birlikte değerlendirilmesi gösterilmiştir.



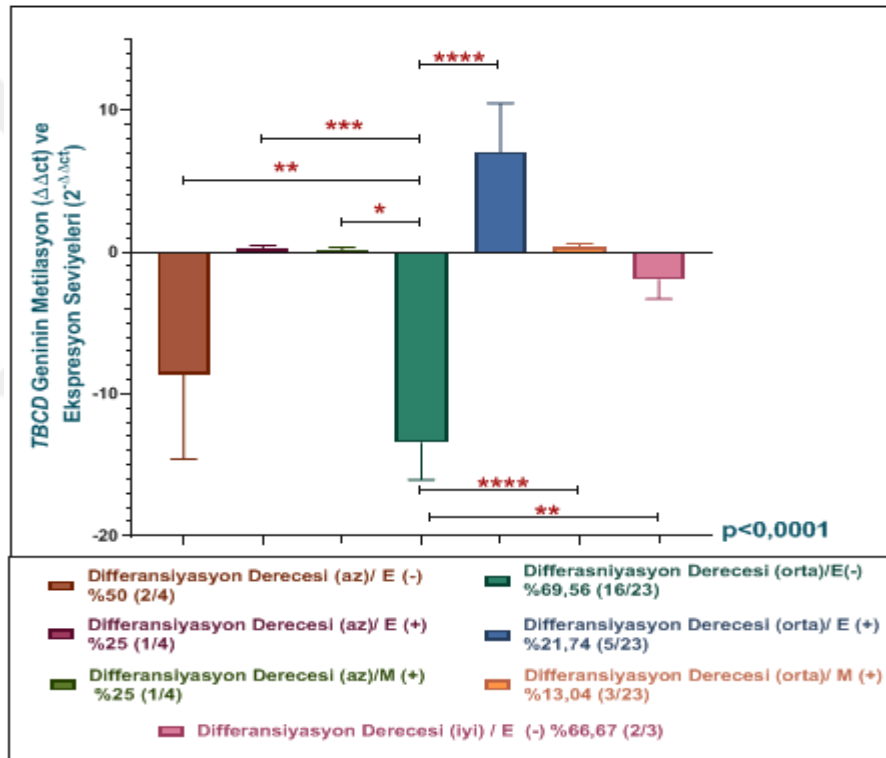
Şekil 4-26: OSCC ve OPML hasta grupları ve sağlıklı grubun metilasyon ve ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin Anova/Friedman analizi ile gösterimi ($p<0,0001$)
 *Gruplar arası anlamlılık derecesi

Malin, premalin ve sağlıklı grupların ekspresyon ve metilasyon seviyeleri karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak ($p<0,0001$) anlamlılık tespit edilmiştir.

Malin hasta grubunda 30 hastadan 20'sinde (%66,66) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyonda azalma ve 6'sında (%20) ekspresyonda artma gözlenirken; 4 hastada (%13,33) metilasyon varlığı gözlenmiştir. Premalin hasta grubunda ise 30 hastadan 12'sinde (%40) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyonda azalma ve 9'unda (%30) ekspresyonda artma gözlenirken; 3 hastada (%10) metilasyon varlığı gözlenmiştir. Sağlıklı mukozada metilasyon varlığı saptanmamıştır. OSCC tanılı hastaların tümör dokusunda ekspresyon seviyelerinde artma ve azalma arasında ($p<0,0001$) ve OPML tanılı hastaların tümör dokusunda ekspresyon seviyelerindeki artma ve azalma arasında ($p<0,0001$) istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir. OSCC tümör dokusunda ekspresyon seviyesinde azalma ile sağlıklı bireylere ait mukozada ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ($p<0,0001$). OPML hastalarının ekspresyon seviyelerindeki azalma ile sağlıklı bireylere ait mukozada ekspresyon seviyeleri arasında ($p=0,0002$),

OSCC ekspresyon azalışı ve OPML ekspresyon artışı arasında ($p<0,0001$) ve OPML hastalarının ekspresyon seviyelerindeki azalma ile OSCC hastalarının ekspresyon seviyelerindeki artma arasında ($p<0,0001$) istatistiksel olarak anlamlılıklar görülmüştür. Malin grupta tümör dokusunda metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerinde azalma arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlenmiştir ($p=0,0048$).

Şekil 4-27’de malin hasta grubunda differansiyasyon derecesi ile metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması gösterilmiş ve bu parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir ($p<0,0001$).



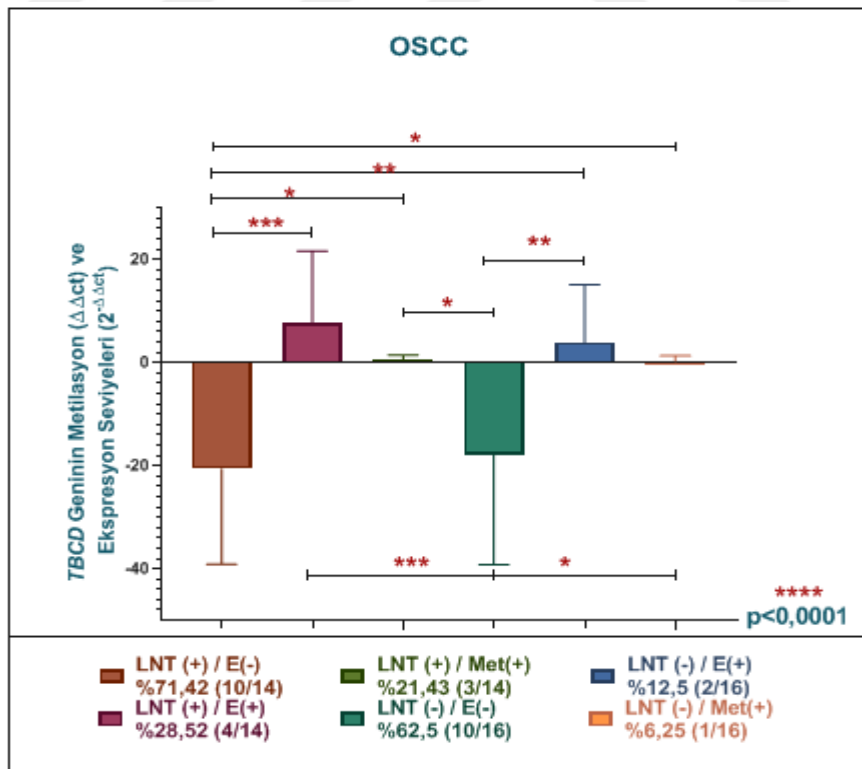
Şekil 4-27: OSCC hasta grubunda TBCD geninin ekspresyon seviyeleri ve promoter bölgesinde meydana gelen metilasyon seviyeleri ile differansiyasyon derecelerinin Anova/ Friedman analizi ile gösterimi ($p<0,0001$) (E: Ekspresyon M: Metilasyon) *Gruplar arası anlamlılık derecesi

Malin hasta grubunda differansiyasyon derecesi az olan 4 hastadan 2’sinde tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma, 1’inde ise ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, 1 hastada metilasyon varlığı saptanmıştır. Differansiyasyon derecesi orta olan 23 hastadan 16’sında tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma, 5’inde ekspresyon seviyesinde

artma gözlenirken, 3 hastada metilasyon varlığı saptanmıştır. Differansiyasyon derecesi iyi olan 3 hastadan 2'sinde ekspresyon seviyesinde azalma gözlenmiş ve metilasyon varlığı saptanmamıştır. OSCC hasta grubunda *TBCD* geninin ekspresyon seviyeleri ve promoter bölgesinde meydana gelen metilasyon seviyeleri ile differansiyasyon dereceleri Anova/ Friedman analizi ile gösterilmiş ve $p<0,0001$ olarak bulunmuştur.

Differansiyasyon derecesi az olup metilasyon gözlenen hastalar ile differansiyasyon derecesi orta olup ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastalar arasında ($p=0,0153$), differansiyasyon derecesi orta olup ekspresyon seviyesinde azalma olan ve differansiyasyon derecesi orta olup ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenen hastalar arasında ($p=0,0001$) ve differansiyasyon derecesi orta olup ekspresyon azalışı olan ve differansiyasyon derecesi orta olup metilasyon gözlemlenen hastalar arasında ($p=0,0145$) istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmiştir.

OSCC hasta grubunda *TBCD* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri, hastalardaki lenf nodu tutulumu varlığına göre One-way ANOVA/Friedman analizi ile Şekil 4-28'de gösterilmiştir.



Şekil 4-28: Malin hasta grubunda lenf nodu tutulumuna göre *TBCD* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin One-way ANOVA/Friedman Analizi ile gösterimi ($p<0,0001$)
(LNT: Lenf nodu tutulumu, E: Ekspresyon M: Metilasyon) *Gruplar arası anlamlılık derecesi

Malin hasta grubunda lenf nodu tutulumu gözlenen 14 hastadan 10'unda tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma, 4'ünde ise ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, 3 hastada metilasyon varlığı saptanmıştır. Lenf nodu tutulumu gözlenmeyen 16 hastadan 10'unda tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma, 2'sinde ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, 1 hastada metilasyon varlığı saptanmıştır. One-way ANOVA/Friedman analizine göre, lenf nodu tutulumu varlığı ile ekspresyon seviyelerinde meydana gelen azalma ve artma arasında ($p=0,0004$), lenf nodu tutulumu olup ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen ve lenf nodu tutulumu olup metilasyon varlığı saptanan hastalar arasında ($p=0,0123$), lenf nodu tutulumu olup ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen ve lenf nodu tutulumu gözlenmeyip ekspresyon seviyesinde artış gözlenen hastalar arasında ($p=0,0040$), lenf nodu tutulumu olup ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen ve lenf nodu tutulumu olmayıp metilasyon gözlemlenen hastalar arasında ($p=0,0231$), lenf nodu tutulumu gözlemlenmeyen ve ekspresyonda azalma gözlenen ve lenf nodu tutulumu olmayıp metilasyon gözlenen hastalar arasında ($p=0,0004$) istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır.

Tablo 4-6 ve tablo 4-7'de malin ve premalin hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları gösterilmiştir.

Tablo 4-6: Malin hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları

		N (%)	Ekspresyonda Azalma % (n)	Ekspresyond a Artma % (n)	Ekspresyonda Değişim Gözlenmeyen	Metilasyon % (n)	Ekspresyond a Azalma ve Metilasyon
Cinsiyet	Kadın	8/30 (%26,67)	5/8 (%62,5)	1/8 (%12,5)	2/8 (%25)	1/8 (%12,5)	1/8 (%12,5)
	Erkek	22/30 (%73,33)	15/22 (%68,2)	3/22 (%13,6)	4/22 (%18,2)	3/22 (%13,6)	1/22 (%4,5)
Yaş	≤50	8/30 (%26,67)	4/8 (%50)	1/8 (%12,5)	3/8 (%37,5)	0/8 (%0)	0/8 (%0)
	>50	22/30 (%73,33)	16/22 (%72,7)	1/22 (%4,5)	3/22 (%13,6)	4/22 (%18,2)	2/22 (%9,1)
Anatomik Tutulum	Dil	10/30 (%33,3)	7/10 (%70)	1/10 (%10)	2/10 (%20)	1/10 (%10)	1/10 (%10)
	Bukkal Mukoza	6/30 (%20)	6/6 (%100)	0/6 (%0)	0/6 (%0)	0/6 (%0)	0/6 (%0)
	Inferior Alveolar Arkus	3/30 (%10)	3/3 (%100)	0/3 (%0)	0/3 (%0)	0/3 (%0)	0/3 (%0)
	Ağız Tabanı	5/30 (%16,6)	2/5 (40)	0/5 (%0)	3/5 (%60)	0/5 (%0)	0/5 (%0)
	Retromolar Trigon	4/30 (%13,3)	2/4 (%50)	1/4 (%25)	1/4 (%25)	3/4 (%75)	2/4 (%50)
	Sert Damak	2/30 (%6,7)	0/2 (%0)	2/2 (%100)	0/2 (%0)	0/2 (%0)	0/2 (%0)
Sigara Tüketimi	Yok	12/30 (%40)	9/12 (%75)	1/12 (%8,3)	2/12 (%16,7)	0/12 (%0)	0/12 (%0)
	Var	18/30 (%60)	11/18 (%61,1)	3/18 (%16,7)	4/18 (%22,2)	4/18 (%22,2)	2/18 (%11,1)
Alkol Tüketimi	Yok	22/30 (%73,33)	14/22 (%63,6)	3/22 (%13,6)	5/22 (%22,8)	2/22 (%22,8)	0/22 (%0)
	Var	8/30 (%26,67)	6/8 (%75)	1/8 (%12,5)	1/8 (%12,5)	2/8 (%25)	2/8 (%25)
Evre	I	2/30 (%6,6)	2/2 (%100)	0/2 (%0)	0/2 (%0)	0/2 (%0)	0/2 (%0)
	II	6/30 (%20)	3/6 (%50)	2/6 (%33,3)	1/6 (%16,7)	1/6 (%16,7)	0/6 (%0)
	III	5/30 (%16,6)	5/5 (%100)	0/5 (%0)	0/5 (%0)	1/5 (%20)	1/5 (%20)
	IV	17/30 (%56,67)	10/17 (%58,8)	2/17 (%11,8)	5/17 (29,4)	2/17 (%11,8)	1/17 (%5,9)
Differansiyasyon Derecesi	Düşük	4/30 (%13,3)	2/4 (%50)	1/4 (%25)	1/4 (%25)	1/4 (%25)	1/4 (%25)
	Orta	23/30 (%76,67)	16/23 (%69,6)	2/23 (%8,7)	5/23 (%21,7)	3/23 (%13)	1/23 (%4,3)
	Yüksek	3/30 (%10)	2/3 (%66,7)	1/3 (%33,3)	0/3 (%0)	0/3 (%0)	0/3 (%0)
Lenf Nodu Tutulumu	Yok	16/30 (%53,3)	10/16 (%62,5)	4/16 (%25)	2/16 (%12,5)	1/16 (%6,2)	0/16 (%0)
	Var	14/30 (%46,67)	10/14 (%71,4)	0/14 (%0)	4/14 (%28,6)	3/14 (%21,4)	2/14 (%14,3)
Nüks	Yok	25/30 (%83,3)	17/25 (%68)	2/25 (%8)	6/25 (24)	3/25 (%12)	2/25 (%8)
	Var	5/30 (%16,67)	3/5 (%60)	2/5 (%40)	0/5 (%0)	1/5 (%20)	0/5 (%0)

Tablo 4-6 incelendiğinde bukkal mukoza bölgesinde anatomik tutulum gösteren 6 hastanın tamamında (%100) ve inferior alveolar arkus bölgesinde anatomik tutulum gösteren 3 hastanın tamamında (%100) ekspresyonda azalma gözlemlendiği görülmektedir. Bu bölgelerde tümör dokusunda normal dokuya kıyasla ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastaların metilasyon seviyesinde bir değişim saptanmamıştır. Metilasyon gözlenen 4 hastanın 2'si retromolar trigon, 1 tanesi ise dil bölgesindedir. Metilasyon gözlenen hastaların ekspresyon seviyelerinde azalma mevcuttur. Metilasyon saptanan 1 hastada (retromolar trigon) ekspresyon seviyesinde değişim gözlenmemiştir.

Sigara ve alkol tüketimi incelendiğinde sigara tüketimi ve ekspresyonda azalma arasında anlamlılık tespit edilmiş olup, alkol tüketimi ile ekspresyon seviyelerindeki değişim arasında anlamlılık bulunmamıştır. Tabloya bakıldığında sigara tüketimi mevcut olan ve ekspresyonda azalma gözlenen hastaların 2'sinde metilasyon saptandığı görülmektedir. 1 hastada ekspresyon artışı gözlenirken, 1 hastanın ekspresyon seviyesinde değişim olmadığı gözlenmiştir. Alkol tüketen hastaların 2'sinde ekspresyonda azalmaya bağlı metilasyon varlığı gözlenmiştir.

Evrelere göre tablo incelendiğinde erken evreden geç evreye doğru ekspresyon seviyesinde azalma mevcut olduğu ve metilasyon gözlenen hastaların evre 3 ve evre 4 hastası olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yine bukkal mukoza ve inferior alveolar arkus tanımlı OSCC hastaları incelendiğinde sırasıyla 6 hastadan 4'ünün (%66,6) ve 3 hastadan 2'sinin (%66,6) ileri evre (evre III ve evre IV) hastası olduğu saptanmıştır.

Diferansiyasyon derecesi metilasyon varlığına göre incelendiğinde düşük ve orta dereceli diferansiyasyonda metilasyon varlığı saptanmıştır. Orta dereceli diferansiyasyonda metilasyon görülen 1 hastada ekspresyon azalışı gözlenirken, 1 hastada ekspresyon artışı gözlenmiş ve 1 hastada ekspresyon seviyesinde değişim saptanmamıştır. Bu nedenle diferansiyasyon dereceleri ve metilasyon seviyesi arasında bir anlamlılık saptanmamıştır.

Lenf nodu tutulumu gözlenen hastalardan 2 tanesinde metilasyona bağlı ekspresyonda azalma görülürken, 1 hastada ekspresyonda artma saptanmıştır. Lenf nodu tutulumu olmayan 1 hastada metilasyon gözlenmiş ve metilasyon gözlenen hastanın ekspresyon seviyesinde değişim saptanmamıştır.

Nüks gözlenmeyen 25 hastanın 17'sinde ekspresyonda azalma mevcut olup, azalma gözlenen 2 hastada metilasyon saptanmıştır. Metilasyon gözlenen 1 hastada ise ekspresyon artışı mevcuttur.

Tablo 4-7: Premalin hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları

		N (%)	Ekspresyonda Azalma N (%)	Ekspresyonda Artma N (%)	Metilasyon N (%)	Ekspresyonda Değişim Gözlenmeyen	Ekspresyonda Azalma ve Metilasyon
Cinsiyet	Kadın	15/30 (%50)	5/15 (%33,3)	4/15 (%26,7)	2/15 (%13,3)	6/15 (%40)	1/15 (%6,7)
	Erkek	15/30 (%50)	7/15 (%46,7)	5/15 (%33,3)	1/15 (%6,7)	3/15 (%20)	1/15 (%6,7)
Yaş	≤50	15/30 (%50)	7/15 (46,7)	4/15 (%26,7)	1/15 (%6,7)	4/15 (%26,7)	0/15 (%)
	>50	15/30 (%50)	5/15 (%33,3)	5/15 (%33,3)	2/15 (%13,3)	5/15 (%33,3)	2/15 (%13,3)
Patoloji	OL	7/30 (%23,3)	3/7 (%42,8)	2/7 (%28,6)	1/7 (%14,3)	2/7 (%28,6)	1/7 (%14,3)
	OLD	10/30 (%33,3)	5/10 (%50)	2/10 (%20)	2/7 (%25,6)	3/7 (%42,8)	1/7 (%14,3)
	LP	13/30 (43,3)	4/13 (%30,8)	5/13 (%38,5)	0/13 (%)	4/13 (%30,8)	0/13 (%)
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13/30 (%13,3)	5/13 (%38,5)	4/13 (%30,8)	2/13 (%15,4)	4/13 (%30,8)	2/13 (%15,4)
	Var (+)	17/30 (%56,6)	7/17 (%41,2)	5/17 (%29,4)	1/17 (%5,9)	5/17 (%29,4)	0/17 (%)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	24/30 (%80)	8/24 (%33,3)	8/24 (%33,3)	2/24 (%8,3)	8/24 (%33,3)	1/24 (%4,5)
	Var (+)	6/30 (%20)	4/6 (%66,7)	1/6 (%16,7)	1/6 (%16,7)	1/6 (%16,7)	1/16 (%16,7)

Tablo 4-7 incelendiğinde metilasyon varlığı ve patolojik alt gruplar arasında, metilasyon gözlenen OLD tanılı 2 hastanın 1'inde ekspresyonda azalma ve 1 hastada ekspresyonda artma gözlenmiştir. OL tanılı hastaların birinde metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma saptanmıştır.

Sigara tüketimi ile ekspresyon ve metilasyon durumları arasındaki ilişki incelendiğinde sigara kullanmayan hastaların 2'sinde metilasyona bağlı ekspresyonda azalma gözlenmiştir. Sigara tüketimi olan hastaların 1'inde metilasyon varlığı saptanmış, bu hastada ekspresyonda artma gözlenmiştir. Sigara tüketimi ve ekspresyonda azalma tek başına incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur.

Alkol tüketimi olmayan hastalardan 2'sinde metilasyon varlığı saptanmış olup, 1 hastada ekspresyonda azalma ve 1 hastada ekspresyonda artma gözlenmiştir. Alkol tüketen hastalardan 1'inde metilasyona bağlı ekspresyonda azalma saptanmıştır. Alkol tüketimi ile ekspresyon ve metilasyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

Tablo 4-8: OLD tanılı hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları

		N (%)	Ekspresyonda Azalma N (%)	Ekspresyonda Artma N (%)	Metilasyon N (%)	Ekspresyonda Değişim Gözlenmeyen	Ekspresyonda Azalma ve Metilasyon
Cinsiyet	Kadın	7/10 (%70)	3/7 (%42,8)	2/7 (%28,6)	2/7 (%28,6)	2/7 (%28,6)	1/7 (%14,3)
	Erkek	3/10 (%30)	2/3 (%66,7)	0/3 (%0)	0/3 (%0)	1/3 (%33,3)	0/3 (%0)
Yaş	≤50	3/10 (%30)	1/3 (%33,3)	0/3 (%0)	1/3 (%33,3)	2/3 (%66,7)	1/3 (%33,3)
	>50	7/10 (%70)	4/7 (%57,1)	2/7 (%28,6)	2/7 (%28,6)	1/7 (%14,3)	0/7 (%0)
Sigara Tüketimi	Yok (-)	6/10 (%60)	3/6 (%50)	1/6 (%16,7)	1/6 (%16,7)	2/6 (%33,3)	1/6 (%16,7)
	Var (+)	4/10 (%40)	2/4 (%50)	1/4 (%25)	1/4 (%25)	1/4 (%25)	0/4 (%0)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	8/10 (%80)	3/8 (%37,5)	2/8 (%25)	2/8 (%25)	3/8 (%37,5)	1/8 (%12,5)
	Var (+)	2/10 (%20)	2/2 (%100)	0/2 (%0)	0/2 (%0)	0/2 (%0)	0/2 (%0)

Tablo 4-8’de OLD tanılı hasta grubunda klinikopatolojik verilere göre ekspresyon ve metilasyon gözlenen hasta sayıları gösterilmiştir. Tez çalışmamızda 10 adet oral likenoid displazi tanılı hasta mevcuttur. 10 hastadan 7’si (%70) kadın, 3’ü (%30) erkektir. 7 hasta (%70) 50 yaş üzeri iken, 3 hasta (%30) 50 yaşından küçüktür. 4 hasta (%40) sigara ve 2 hasta (%20) alkol tüketmektedir.

Sonuçlar incelendiğinde 10 adet OLD tanılı hastadan 5’inde (%50) ekspresyon seviyesinde azalma, 2’sinde (%20) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, 3 hastada (%30) ekspresyon seviyelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. OPML grubunda metilasyon gözlenen 3 hastadan 2’si (%66,6) OLD tanılıdır. Metilasyon gözlenen 2 hastadan 1’inde (%50) ekspresyonda azalma, 1’inde (%50) ekspresyonda artma gözlenmiştir. Metilasyona bağlı ekspresyon kaybı bulunan hastanın klinik parametreleri incelendiğinde alkol, sigara tüketimi olmayan, 50 yaşından büyük, kadın hasta olduğu görülmektedir. Gözlenen metilasyon değeri %2,23’tür. Metilasyon gözlenip ekspresyonda artma gözlenen 1 hastanın klinik parametreleri incelendiğinde ise sigara tüketimi olup, alkol tüketimi olmayan, 50 yaşından küçük, kadın hasta olduğu görülmektedir. Gözlenen metilasyon değeri %0,23 olarak saptanmıştır.

Projemizin bir ön çalışması niteliğinde olan, Demokan ve ark., tarafından gerçekleştirilen önceki çalışmada metilasyon ve ekspresyon array’de incelenen 4 adet oral likenoid displazi hastasının yaş ortalaması 39,5’tir. 4 hastanın 3’ü (%75) kadın 1’i

(%25) erkektir. 3 hastanın (%75) yaşı 50'den küçük iken, 1 hasta (%25) 50 yaş üzeridir. Sigara hasta sayısı 3 (%75), alkol kullanan hasta sayısı 1 (%25) ve hem sigara hem alkol kullanan hasta sayısı ise 1'dir (%25). Hastaların 3'ünün (%75) anatomik bölgesi bukkal mukoza iken diğer bir hastanın anatomik bölgesinin dil (%25) olduğu görülmektedir. Metilasyon ekspresyon array sonuçlarına bakılarak, oral likenoid displazi tümör-normal doku karşılaştırmasında *TBCD* geninin CpG bölgelerinde tümör grupları metillenmiş, buna bağlı olarak ekspresyon seviyeleri down-regüle olduğu tespit edilmiştir. *TBCD* geninin hipermetilasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).



5. TARTIŞMA

Ağız boşluğunun yassı epitel hücrelerinden kaynaklanan bir kanser türü olan oral skuamöz hücreli karsinom, baş-boyun kanserleri arasında en sık görülen malin tümördür ve insidansı son yıllarda giderek artmaktadır (Wang et al., 2013). OSCC genelde ileri evrede teşhis edildiğinden için yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir. Hastalığın beş yıllık sağkalım oranı yaklaşık %50 civarındadır (Kademani, 2007). OSCC’de sigara, alkol kullanımı, tütün çiğnenmesi, beslenme alışkanlıkları, genetik/viral etkenler gibi faktörlerin yanı sıra, oral mukozada meydana gelen morfolojik değişikliklerle birlikte klinik olarak gözle görülebilen premalin lezyonların oluşumunun hastalığın ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (Lodi et al., 2016).

Oral kavitenin prekanseröz lezyonları (OPML), farklı oranlarda malin transformasyon riski olan hastalıklardır. Bu lezyonların geç evrelerde, şiddetli displazi ve karsinoma in situ ve/veya skuamöz hücreli karsinomlara dönüşme riskleri yüksek olduğundan erken teşhis oldukça önemlidir (Reibel, 2003).

Literatür incelendiğinde nöronal proliferasyon ve migrasyondaki mikrotübül davranışlarının *TBCD*’nin normal fonksiyonlarına bağlı olduğu görülmektedir (Edvardson et al., 2016). Otozomal resesif hastalıklarda *TBCD* geninin biallelik varyantları, *TBCD* protein ekspresyon seviyelerinin azalmasına ve buna bağlı olarak α - β -tubulin heterodimer oluşumunun azalmasına sebep olmaktadır. Bozuk mikrotübül dinamiklerinin normal nöronal fonksiyonu ve sağkalımı bozduğu bilinmektedir (Pode-Shakked et al., 2017).

Son zamanlarda, α/β -tübülün heterodimerinin birleşmesi ve ayrılması için gereken beş ko-şaperondan birini kodlayan *TBCD* genindeki varyantların nörodejeneratif bozukluğa sebep olabildiği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, beyin görüntülemeye mikrosefali, zihinsel engellilik, inatçı nöbetler, optik sinir solukluğu / atrofi ve kortikal atrofi rahatsızlıkları bulunan beş hastanın periferik kan lökositlerinden genomik DNA elde edilerek tüm eksom sekanslama yöntemi ile incelenmiş ve *TBCD* geninde c.1423G>A missense mutasyonu tespit edilerek *TBCD*’nin hem down regülasyonunun hem de aşırı ekspresyonunun mikrotübül yeniden

düzenlenmesi ve işlevi üzerinde zararlı etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Pod-Shakked et al., 2017).

Önceki projemizdeki metilasyon ve ekspresyon array sonuçlarına göre oral likenoid displazi grubunda istatistiksel anlamlılık bulunan *TBCD* genine ait promoter metilasyon durumu ve ekspresyon seviyesindeki değişiklikler OSCC ve OPML hastalarının doku ve vücut sıvılarında incelendi. OSCC tanısı alan 30 hastanın %66,6'sında (20/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma ve %20'sinde (6/30) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken, OPML tanısı alan 30 hastanın %40'ında (12/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma ve %30'unda (9/30) ekspresyon seviyesinde artma gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde sağlıklı dokuda *TBCD* geninin ekspresyon seviyelerinin normal düzeyde seyrettiği bildirilmiştir (Binarová & Tuszyński, 2019). Çalışmamızda malin tümör dokusunda eşlenik normal dokuya kıyasla *TBCD* geninin ekspresyon seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,0001$) ve sonuçlarımız bu açıdan literatür ile uyumludur. Aynı zamanda premalin dokuda eşlenik normal dokuya kıyasla *TBCD* geninin ekspresyon seviyesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0,0004$).

Malin ve premalin hasta grubunda sigara tüketimi ile tümör dokusunda normal dokuya oranla ekspresyon azalışı arasında istatistiksel olarak (sırasıyla $p = 0,0022$, $p < 0,0001$) anlamlılık gözlenmiştir. Hastalar anatomik tutulum bölgelerine göre sınıflandırılarak ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında bukkal mukoza bölgesinde anatomik tutulum gösteren 6 hastanın tamamında (%100) ve inferior alveolar arkus bölgesinde anatomik tutulum gösteren 3 hastanın tamamında (%100) ekspresyonda azalma gözlemlenmiş ve yine bukkal mukoza ve inferior alveolar arkus tanıli OSCC hastaları incelendiğinde sırasıyla 6 hastadan 4'ünün (%66,6) ve 3 hastadan 2'sinin (%66,6) ileri evre (evre III ve evre IV) hastası olduğu saptanmıştır.

Literatürde, *TBCD* geninde meydana gelen metilasyon değişimlerinin incelendiği 3 adet çalışma bulunmaktadır (S. Guo et al., 2017)(Barrow et al., 2020)(Zykovich et al., 2014). Ancak OSCC ve OPML hastalarında metilasyona bağlı ekspresyon değişimlerini aynı anda inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalardan birinde romatoid artrit hastalarında meydana geldiği bilinen CD4+T hücrelerindeki düzensiz DNA metilasyonunun belirleyebilmek adına,

Illumina metilasyon 450K mikroarray yöntemi kullanılarak CD4+T hücresinin genom çapındaki DNA metilasyon değişikliklerinin profili incelenmiştir. Bu çalışmada 12 adet romatoid artrit hasta dokusu ve aynı hastaların eşlenik normal dokuları kullanılmış ve *HDAC4*, *NXN*, *TBCD* ve *TMEM61* genlerinin romatoid artrit dokularında hipermetile olduğu bildirilmiştir (S. Guo et al., 2017).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada kronik lenfositik lösemide *TBCD*'nin aşırı ekspresyonu, LINE-1 ve Alu gibi retrotranspozonların promoter bölgelerinde meydana gelen hipometilasyon ile ilişkilendirilmiştir. LINE-1 ve Alu gibi retrotranspozonlar insan genomunun %25'inden fazlasını oluşturmaktadır. solid tümörlerde Bu elementlerin global DNA hipometilasyona uğradığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmada internette kullanıma açık olan HM450K ve gen ekspresyon mikroarray veri datasetleri kullanılmıştır. Kronik lenfositik lösemide dokuz lokusta hipometilasyon (>%90 hasta) gözlenmiştir. Diferansiyel metilasyon, LINE-1 ve Alu elementlerinin evrimsel yaşı ile ilişkili bulunmuş olup lokusa özgü hipometilasyon, *DCLK2*, *HK1*, *ILRUN*, *TANK*, *TBCD*, *TNFRSF1B* ve *TXNRD2* dahil olmak üzere proksimal genlerin diferansiyel ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur (Barrow et al., 2020).

Zykovich ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada sağlıklı genç yetişkinlere kıyasla sağlıklı yaşlı yetişkinlerden alınan iskelet kası-postmitotik dokudaki DNA metilasyon dinamikleri, genom çapında Illumina 450K methylation array yöntemiyle incelenmiştir. Genç ve yaşlı gruplar arasında insan iskelet kasında genel bir genomik hipermetilasyon eğilimi bulunmuştur. İki grup arasında farklı şekilde metillenmiş 5963 CpG bölgesi belirlenmiş ve bunların %92'si (5518 CpG bölgesi) daha yaşlı deneklerde hipermetillenirken, geri kalan %8'i hipometilasyon eğilimi göstermiştir. Yaşlı iskelet kasından alınan DNA'da intragenik olarak en az bir CpG bölgesi bulunan 2114 gen belirlenmiştir. Yaşlanmadan etkilenen bir gen örneği, *TBCD* genidir ve bu gen yüksek sayıda intragenik CpG adacığına sahiptir (46 farklı bölge). Bunlardan 45'inin genç kas dokusuna göre yaşlı grupta hipermetile olduğu bildirilmiştir (Zykovich et al., 2014). Bizim bulgularımıza göre, OSCC hasta grubunda metile olan hastaların tamamı ve OPML grubunda metile olan hastaların %66,7'sinin ileri yaş hasta olduğu tespit edilmiştir. OSCC hastalarının ekspresyon seviyesinde azalma gözlenenlerin %72'sinin ileri yaş, OPML hastalarının ise %33,3'ünün de ileri yaş olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda OSCC, OPML ve sağlıklı bireylere ait doku ve vücut sıvılarında *TBCD* geninin metilasyon seviyesi incelenmiştir. OSCC hastalarına ait tümör dokusu örneklerinde *TBCD* geninin promoter bölgesinde 4/30 (%13,3) hastada metilasyon gözlenirken OPML hastalarına ait tümör dokusu örneklerinde *TBCD* geninin promoter bölgesinde 3/30 hastada (%10) metilasyon gözlenmiştir. Tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastaların eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinde metilasyon varlığı saptanmamıştır.

OSCC tanılı hastalarda *TBCD* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenen 4 hastanın 2'sinde ise metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir. 1 hastada ekspresyon seviyesinde artış meydana gelirken, 1 hastada herhangi bir değişim gözlenmemiştir. OSCC hasta grubunda metilasyon gözlenen hastalar ile ekspresyonda azalma gözlenen hastalar arasında one-way Anova/Friedman Test analizine göre istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ($p=0,0048$).

OPML tanılı hastalarda *TBCD* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenen 3 hastanın 2'sinde ise metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma ve 1 hastada ekspresyon seviyesinde artış meydana geldiği gözlenmiştir. Premalin hasta grubunda yapılan one-way Anova/Friedman test analizine göre; metilasyon gözlenen hastalar ile ekspresyonda azalma gözlenen hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p=0,0173$).

Metilasyon gözlenen hastalar ile lenf nodu tutulumu ($p=0,0123$) ve differansiyasyon derecesi ($p<0,0001$) arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir.

Önceki projenin ve bu projenin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde OPML grubunda oral likenoid displazi patolojisine sahip hastalarda *TBCD* geninin promoter bölgelerinde metilasyon varlığının saptandığı görülmektedir. Ancak ekspresyon seviyesinde meydana gelen kaybın metilasyona bağlı mekanizma ile gerçekleştiğini aydınlatabilmek için daha geniş sayıdaki OLD tanılı hasta grubunda çalışmanın devamı gerekmektedir.

Projemizde, OSCC ve OPML tanılı hastaların tümör dokularında eşlenik normal dokuya oranla *TBCD* genine ait ekspresyon seviyelerinde belirgin bir azalma meydana gelirken, metilasyon/ekspresyon seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde belirgin bir anlamlılık tespit edilememiştir. Ekspresyonda azalma çeşitli klinik parametrelere göre değerlendirildiğinde sigara tüketimi ve geç evre (III-IV) ile ekspresyon azalışı arasında

anlamlılık tespit edilmiştir. OSCC hastalarında bukkal mukoza ve inferior alveolar arkus bölgesi ile OPML hastalarında oral likenoid displazi alt grubunda meydana gelen ekspresyonda azalma diğer gruplara göre daha anlamlı bulunmuştur. Oral likenoid displazi, diğer premalin alt gruplarına göre maliniteye dönüşüm riski yüksek displazi grubudur. Ayrıca, OSCC hastalarında ekspresyon seviyesindeki kat değişimleri TNM gruplarına göre değerlendirildiğinde evre I'den IV'e doğru TNM derecesi arttıkça ekspresyon seviyesindeki azalma kat sayılarının arttığı gözlenmiştir. Bu durum, tümörün agresifliği ile *TBCD* geninin ekspresyon seviyesindeki azalmanın arasında doğru orantı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, *TBCD* geninde tümör dokusunda meydana gelen ekspresyon seviyesinde azalmanın, özellikle OSCC'nin spesifik alt grubu olan inferior alveolar arkus ve bukkal mukoza tümörleri ile OPML'nin spesifik alt grubu olan OLD tanı ve progresyonunda önemli rol oynayabileceği ve epigenetik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- A.Y., L., & P.A., W. (2011). Cancer biology and NuRD: A multifaceted chromatin remodelling complex. In *Nature Reviews Cancer*.
- Abbate, G., Foscolo, A. M., Gallotti, M., Lancella, A., & Mingo, F. (2006). Neoplastic transformation of oral lichen: case report and review of the literature. In *Acta otorhinolaryngologica Italica: organo ufficiale della Società italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*.
- Ahuja, N., Sharma, A. R., & Baylin, S. B. (2016). Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annual Review of Medicine*.
- Al-Hashimi, I., Schifter, M., Lockhart, P. B., Wray, D., Brennan, M., Migliorati, C. A., Axéll, T., Bruce, A. J., Carpenter, W., Eisenberg, E., Epstein, J. B., Holmstrup, P., Jontell, M., Lozada-Nur, F., Nair, R., Silverman, B., Thongprasom, K., Thornhill, M., Warnakulasuriya, S., & van der Waal, I. (2007). Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*.
- Andre, K., Schraub, S., Mercier, M., & Bontemps, P. (1995). role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the doubs region of France. *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*.
- Auluck, A. (2007). Dyskeratosis congenita. Report of a case with literature review. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*.
- Axell, T., Holmstrup, P., Kramer, I. R. H., Pindborg, J. J., & Shear, M. (1984). International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*.
- Axéll, T., Pindborg, J. J., Smith, C. J., & Van Der Waal, I. (1996). Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: Conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. *Journal of Oral Pathology and Medicine*.
- Baldwin, C., Garnis, C., Zhang, L., Rosin, M. P., & Lam, W. L. (2005). Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. *Cancer Research*.

- Bao, Y., & Shen, X. (2011). SnapShot: Chromatin remodeling: INO80 and SWR1. *Cell*, 144(1), 158-158.e2.
- Baran, I., Nalcaci, R., & Kocak, M. (2010). Dyskeratosis congenita: clinical report and review of the literature. In *International journal of dental hygiene*.
- Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., & Sidransky, D. (2005). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). In *WHO Classification of Tumours (3rd edition)*.
- Barrow, T. M., Wong Doo, N., Milne, R. L., Giles, G. G., Willmore, E., Strathdee, G., & Byun, H.-M. (2020). Analysis of retrotransposon subfamily DNA methylation reveals novel early epigenetic changes in chronic lymphocytic leukaemia. *Haematologica*, haematol.2019.228478.
- Bártová, E., Krejčí, J., Harničarová, A., Galiová, G., & Kozubek, S. (2008). Histone modifications and nuclear architecture: A review. In *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.
- Binarová, P., & Tuszyński, J. (2019). Tubulin: Structure, Functions and Roles in Disease. In *Cells*.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. In *Nature*.
- Blot, W. J. (1992). Alcohol and cancer. *Cancer Research*.
- Bongiorno, M., Rivard, S., Hammer, D., & Kentosh, J. (2017). Malignant transformation of oral leukoplakia in a patient with dyskeratosis congenita. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., & Ang, K. K. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*.
- Bosetti, C., Gallus, S., Trichopoulou, A., Talamini, R., Franceschi, S., Negri, E., & La Vecchia, C. (2003). Influence of the Mediterranean Diet on the Risk of Cancers of the Upper Aerodigestive Tract. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.

- Bottoni, P., & Scatena, R. (2015). The Role of CA 125 as Tumor Marker : Biochemical and Clinical Aspects Introduction : Biochemical. *Adv Exp Med Biol.*, 867, 229–244.
- Bouquot, J. E., & Gorlin, R. J. (1986). Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*.
- Boy, S. C. (2012). Leukoplakia and erythroplakia of the oral mucosa--a brief overview. In *SADJ : journal of the South African Dental Association = tydskrif van die Suid-Afrikaanse Tandheelkundige Vereniging*.
- Boyle, J. O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R. H., Roa, R. A., Correo, R., Eby, Y. J., Ruppert, J. M., & Sidransky, D. (1993). The Incidence of p53 Mutations Increases with Progression of Head and Neck Cancer. *Cancer Research*.
- Boyle, P., & Levin, B. (2014). International Agency for Research on Cancer, World Cancer Report. In *International Agency for Research on Cancer, WHO*.
- Brugere, J., Guenel, P., Leclerc, A., & Rodriguez, J. (1986). Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer*.
- Caballero, O. L., & Chen, Y. (2009). *Cancer / testis (CT) antigens : Potential targets for immunotherapy*.
- Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213–221.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. In *Nature Reviews Cancer*.
- Carvalho, A. L., Jeronimo, C., Kim, M. M., Henrique, R., Zhang, Z., Hoque, M. O., Chang, S., Brait, M., Nayak, C. S., Jiang, W. W., Claybourne, Q., Tokumaru, Y., Lee, J., Goldenberg, D., Garrett-Mayer, E., Goodman, S., Moon, C. S., Koch, W., Westra, W. H., ... Califano, J. A. (2008). Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*.
- Chen, I. H., Chang, J. T., Liao, C. T., Wang, H. M., Hsieh, L. L., & Cheng, A. J. (2003). Prognostic significance of EGFR and Her-2 in oral cavity cancer in betel quid

- prevalent area. *British Journal of Cancer*.
- Chimenos Küstner, E., Jané Salas, E., López López, J., & Rose-Iló Llabrés, X. (2003). Importance of diet in the prevention of oral cancer. *Medicina Oral*.
- Choudhari, S. K., Chaudhary, M., Gadbail, A. R., Sharma, A., & Tekade, S. (2014). Oxidative and antioxidative mechanisms in oral cancer and precancer: A review. In *Oral Oncology*.
- Chuang, J. C., & Jones, P. A. (2007). Epigenetics and microRNAs. In *Pediatric Research*.
- D., F., & N., D. (2010). Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clinics in Dermatology*.
- Dahiya, M. C., Redding, S. W., Dahiya, R. S., Eng, T. Y., Kirkpatrick, W. R., Coco, B. J., Sadkowski, L. C., Fothergill, A. W., Waite, A., Rinaldi, M. G., Patterson, T. F., & Thomas, C. R. (2003). Oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*.
- Dalianis, T. (2014). Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (review). In *International Journal of Oncology*.
- Danielsson, K., Wahlin, Y. B., Gu, X., Boldrup, L., & Nylander, K. (2012). Altered expression of miR-21, miR-125b, and miR-203 indicates a role for these microRNAs in oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology and Medicine*.
- Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., Kotsinas, A., Gorgoulis, V., Field, J. K., & Liloglou, T. (2009). Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*.
- de Oliveira Ribeiro, A., da Silva, L. C. F., & Martins-Filho, P. R. S. (2014). Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. *International Journal of Dermatology*.
- De Sampaio Góes, F. C. G., Oliveira, D. T., Dorta, R. G., Nishimoto, I. N., Landman, G., & Kowalski, L. P. (2004). Prognoses of Oral Basaloid Squamous Cell

- Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma: A Comparison. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*.
- Dietrich, T., Reichart, P. A., & Scheifele, C. (2004). Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncology*.
- Dilhari, A., Weerasekera, M. M., Siriwardhana, A., Maheshika, O., Gunasekara, C., Karunathilaka, S., Nagahawatte, A., & Fernando, N. (2016). Candida infection in oral leukoplakia: an unperceived public health problem. *Acta Odontologica Scandinavica*.
- Dillon, N. (2006). Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus. *Chromosome Research*.
- Edvardson, S., Tian, G., Cullen, H., Vanyai, H., Ngo, L., Bhat, S., Aran, A., Daana, M., Da'amseh, N., Abu-Libdeh, B., Cowan, N. J., Heng, J. I. T., & Elpeleg, O. (2016). Infantile neurodegenerative disorder associated with mutations in TBCD, an essential gene in the tubulin heterodimer assembly pathway. *Human Molecular Genetics*, 25(21), 4635–4638.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*.
- Farthing, P. M., Matear, P., & Cruchley, A. T. (1990). The activation of Langerhans cells in oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology & Medicine*.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*.
- Fitzpatrick, S. G., Hirsch, S. A., & Gordon, S. C. (2014). The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions A systematic review. *Journal of the American Dental Association*.
- Flex, E., Niceta, M., Cecchetti, S., Thiffault, I., Au, M. G., Capuano, A., Piermarini, E., Ivanova, A. A., Francis, J. W., Chillemi, G., Chandramouli, B., Carpentieri, G., Haaxma, C. A., Ciolfi, A., Pizzi, S., Douglas, G. V., Levine, K., Sferra, A., Dentici, M. L., ... Tartaglia, M. (2016). Biallelic Mutations in TBCD, Encoding

- the Tubulin Folding Cofactor D, Perturb Microtubule Dynamics and Cause Early-Onset Encephalopathy. *American Journal of Human Genetics*, 99(4), 962–973.
- Gandini, S., Botteri, E., Iodice, S., Boniol, M., Lowenfels, A. B., Maisonneuve, P., & Boyle, P. (2008). Tobacco smoking and cancer: A meta-analysis. *International Journal of Cancer*.
- Gasche, J. A., & Goel, A. (2012). Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncology*, 8(11), 1407–1425.
- Geneva: World Health Organization. (1973). World Health Organization. Report of a meeting of investigators on the histological definition of precancerous lesions. CAN/731, Geneva.
- Grandis, J. R., Drenning, S. D., Zeng, Q., Watkins, S. C., Melhem, M. F., Endo, S., Johnson, D. E., Huang, L., He, Y., & Kim, J. D. (2000). Constitutive activation of stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Gschwind, A., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. In *Nature Reviews Cancer*.
- Guo, F., Jian, X. chun, Zhou, S. hui, Li, N., Hu, Y. jia, & Tang, Z. gui. (2011). [A retrospective study of oral squamous cell carcinomas originated from oral submucous fibrosis]. *Chinese Journal of Stomatology*.
- Guo, S., Zhu, Q., Jiang, T., Wang, R., Shen, Y., Zhu, X., Wang, Y., Bai, F., Ding, Q., Zhou, X., Chen, G., & He, D. Y. (2017). Genome-wide DNA methylation patterns in CD4⁺ T cells from Chinese Han patients with rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology*, 27(3), 441–447.
- Haksever, M. (2013). *Oral Kavite Kanserlerinde Evreleme , Prognostik Faktörler ve Evreleme Sistemi Üzerine Değerlendirmeler Staging , Prognostic Factors in Oral Cavity Cancers and Evaluation of Staging System*. 3, 109–117.
- Hooper, S. J., Wilson, M. J., & Crean, S. J. (2009). Exploring the link between microorganisms and oral cancer: A systematic review of the literature. In *Head and Neck*.
- Huang, C. J., Clifford Chao, K. S., Tsai, J., Simpson, J. R., Haughey, B., Spector, G. J., & Sessions, D. G. (2001). Cancer of retromolar trigone: Long-term radiation

therapy outcome. *Head and Neck*.

- Izumo, T. (2011). Oral premalignant lesions: From the pathological viewpoint. In *International Journal of Clinical Oncology*.
- Jadotte, Y. T., & Schwartz, R. A. (2012). Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I. Diagnostic insights. In *Journal of the American Academy of Dermatology*.
- Jemec, G. B. E., Ullman, S., Goodfield, M., Bygum, A., Olesen, A. B., Berth-Jones, J., Nyberg, F., Cramers, M., Faergemann, J., Andersen, P., Kuhn, A., & Ruzicka, T. (2009). A randomized controlled trial of R-salbutamol for topical treatment of discoid lupus erythematosus. *British Journal of Dermatology*.
- Jing, J., Li, L., He, W., & Sun, G. (2006). Prognostic Predictors of Squamous Cell Carcinoma of the Buccal Mucosa With Negative Surgical Margins. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. In *Nature Reviews Genetics*.
- Kademani, D. (2007). Oral cancer. *Mayo Clinic Proceedings*.
- Kang, H., Kiess, A., & Chung, C. H. (2015). Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. In *Nature Reviews Clinical Oncology*.
- Kanwal, R., & Gupta, S. (2010). Epigenetics and cancer. In *Journal of Applied Physiology*.
- Kasten, M. M., Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2011). SnapShot: Chromatin remodeling: SWI/SNF. *Cell*, 144(2), 310-310.e1.
- Kato, I., & Nomura, A. M. Y. (1994). Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. In *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*.
- Khan, Z., Khan, S., Christianson, L., Rehman, S., Ekwunife, O., & Samkange-Zeeb, F. (2016). Smokeless tobacco and oral potentially malignant disorders in South Asia: A protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*.
- Kim, K. H., Choi, J. S., Kim, I. J., Ku, J. L., & Park, J. G. (2006). Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cells liners and cancer tissues. *World Journal of*

Gastroenterology.

- Kirwan, M., & Dokal, I. (2008). Dyskeratosis congenita: A genetic disorder of many faces. In *Clinical Genetics*.
- Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., & Cedar, H. (2016). DNA methylation in cancer and aging. In *Cancer Research*.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. In *Cell*.
- Kresty, L. A., Mallery, S. R., Knobloch, T. J., Song, H., Lloyd, M., Casto, B. C., & Weghorst, C. M. (2002). Alterations of p16^{INK4a} and p14^{ARF} in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Research*.
- Kumar, R., Li, D. Q., Müller, S., & Knapp, S. (2016). Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene*, 35(34), 4423–4436.
- Kune, G. A., Kune, S., Field, B., Watson, L. F., Cleland, H., Merenstein, D., & Vitetta, L. (1993). Oral and Pharyngeal Cancer, Diet, Smoking, Alcohol, and Serum Vitamin A and β -Carotene Levels: A Case-Control Study in Men. *Nutrition and Cancer*.
- Kupferman, M. E., & Myers, J. N. (2006). Molecular Biology of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. In *Otolaryngologic Clinics of North America*.
- Lee, J., Taneja, V., & Vassallo, R. (2012). Cigarette smoking and inflammation: Cellular and molecular mechanisms. In *Journal of Dental Research*.
- Lee, Y. C. A., Marron, M., Benhamou, S., Bouchardy, C., Ahrens, W., Pohlmann, H., Lagiou, P., Trichopoulos, D., Agudo, A., Castellsague, X., Bencko, V., Holcatova, I., Kjaerheim, K., Merletti, F., Richiardi, L., Macfarlane, G. J., Macfarlane, T. V., Talamini, R., Barzan, L., ... Hashibe, M. (2009). Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*.
- Lewis, S. A., Tian, G., & Cowan, N. J. (1997). The α - and β -tubulin folding pathways. In *Trends in Cell Biology*.
- Lewis, S. A., Tian, G., Vainberg, I. E., & Cowan, N. J. (1996). Chaperonin-mediated folding of actin and tubulin. In *Journal of Cell Biology*.

- Lingen, M. W., Kalmar, J. R., Karrison, T., & Speight, P. M. (2008). Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. In *Oral Oncology*.
- Lo, W. L., Kao, S. Y., Chi, L. Y., Wong, Y. K., & Chang, R. C. S. (2003). Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: Factors affecting survival. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*.
- Lodi, G., Franchini, R., Warnakulasuriya, S., Varoni, E. M., Sardella, A., Kerr, A. R., Carrassi, A., Macdonald, L. C. I., & Worthington, H. V. (2016). Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(7).
- Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, A., Coll, M., & Zabala, J. C. (2001). Review: Postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. In *Journal of Structural Biology*.
- Lourenço, S. V., Nacagami Sotto, M., Constantino Vilela, M. A., Rodrigues Gonçalves De Carvalho, F., Rivitti, E. A., & Menta Simonsen Nico, M. (2006). Lupus erythematosus: Clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of epithelial maturation. *Journal of Cutaneous Pathology*.
- Lydiatt, D. D., Robbins, K. T., Byers, R. M., & Wolf, P. F. (1993). Treatment of stage I and II oral tongue cancer. *Head & Neck*.
- Macfarlane, G. J., Zheng, T., Marshall, J. R., Boffetta, P., Niu, S., Brasure, J., Merletti, F., & Boyle, P. (1995). Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology*.
- Mao, L., Lee, J. S., Fan, Y. H., Ro, J. Y., Batsakis, J. G., Lippman, S., Hittelman, W., & Hong, W. K. (1996). Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nature Medicine*.
- Masuda, M., Suzui, M., Yasumatu, R., Nakashima, T., Kuratomi, Y., Azuma, K., Tomita, K., Komiyama, S., & Weinstein, I. B. (2002). Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck

- squamous cell carcinoma. *Cancer Research*.
- McGuirt, W. F. (1982). Panendoscopy as a screening examination for simultaneous primary tumors in head and neck cancer: a prospective sequential study and review of the literature. *The Laryngoscope*.
- Medicine, O., Surgery, M., Academy, S., & Paulo, S. (2018). *Potentially Malignant Oral Disorders and*. 3229, 3223–3229.
- Mendelsohn, J., & Baselga, J. (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. In *Journal of Clinical Oncology*.
- Meurman, J. H. (2010). Infectious and dietary risk factors of oral cancer. In *Oral Oncology*.
- Mitra, S. A., Mitra, A. P., & Triche, T. J. (2012). A central role for long non-coding RNA in cancer. *Frontiers in Genetics*.
- Miyake, N., Fukai, R., Ohba, C., Chihara, T., Miura, M., Shimizu, H., Kakita, A., Imagawa, E., Shiina, M., Ogata, K., Okuno-Yuguchi, J., Fueki, N., Ogiso, Y., Suzumura, H., Watabe, Y., Imataka, G., Leong, H. Y., Fattal-Valevski, A., Kramer, U., ... Matsumoto, N. (2016). Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. *American Journal of Human Genetics*, 99(4), 950–961.
- Montero, P. H., & Patel, S. G. (2015). Cancer of the Oral Cavity. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 24(3), 491–508.
- Mortazavi, H., Baharvand, M., & Mehdipour, M. (2014). Oral potentially malignant disorders: an overview of more than 20 entities. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*.
- Murti, P. R., Bhonsle, R. B., Gupta, P. C., Daftary, D. K., Pindborg, J. J., & Mehta, F. S. (1995). Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. In *Journal of Oral Pathology & Medicine*.
- Nagao, T., Warnakulasuriya, S., Hasegawa, S., Sakuma, H., Miyabe, S., Komaki, K., Ishii, K., Machida, J., Kimura, M., Kuroyanagi, N., Saito, T., Takeuchi, G., Ohyabu, T., Shimozaoto, K., & Hashimoto, S. (2016). Elucidating risk factors for

- oral leukoplakia affecting gingivae in Japanese subjects. *Translational Research in Oral Oncology*.
- Nagy, K. N., Sonkodi, I., Szöke, I., Nagy, E., & Newman, H. N. (1998). The microflora associated with human oral carcinomas. *Oral Oncology*.
- Neville, B. W., & Day, T. A. (2002). Oral cancer and precancerous lesions. [Review] [119 refs]. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Nogales, E. (2001). Structural insights into microtubule function. In *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*.
- Nogales, Eva, Whittaker, M., Milligan, R. A., & Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*.
- Omura, K. (2014). Current status of oral cancer treatment strategies: Surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*, 19(3), 423–430.
- Palacios, C., Joshipura, K. J., & Willett, W. C. (2009). Nutrition and health: Guidelines for dental practitioners. In *Oral Diseases*.
- Pan, Y., Liu, G., Zhou, F., Su, B., & Li, Y. (2018). DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clinical and Experimental Medicine*, 18(1).
- Petti, S. (2003). Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: A systematic review. *Oral Oncology*.
- Pindborg, J. J., Reichart, P. A., Smith, C. J., & van der Waal, I. (1997). Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. In *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa*.
- Pode-Shakked, B., Barash, H., Ziv, L., Gripp, K. W., Flex, E., Barel, O., Carvalho, K. S., Scavina, M., Chillemi, G., Niceta, M., Eyal, E., Kol, N., Ben-Zeev, B., Bar-Yosef, O., Marek-Yagel, D., Bertini, E., Duker, A. L., Anikster, Y., Tartaglia, M., & Raas-Rothschild, A. (2017). Microcephaly, intractable seizures and developmental delay caused by biallelic variants in TBCD: further delineation of a new chaperone-mediated tubulinopathy. *Clinical Genetics*, 91(5), 725–738.
- R.Bte., Z., N., I., P.C., G., S., W., C.W., V. W., P., S., & T., A. (1999). Oral mucosal lesions associated with betel quid, areca nut and tobacco chewing habits:

- Consensus from a workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-27, 1996. *Journal of Oral Pathology and Medicine*.
- Ray, J. G., Ranganathan, K., & Chattopadhyay, A. (2016). Malignant transformation of oral submucous fibrosis: overview of histopathological aspects. In *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*.
- Reibel, J. (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: Significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*.
- Reichart, P. A., & Philipsen, H. P. (2005). Oral erythroplakia—a review. *Oral Oncology*, 41(6), 551–561.
- Reidy, J., McHugh, E., & Stassen, L. F. A. (2011). A review of the relationship between alcohol and oral cancer. In *Surgeon*.
- Reis, A. H. O., Vargas, F. R., & Lemos, B. (2016). Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics. In *Tumor Biology*.
- Riggs, A. D., & Jones, P. A. (1983). 5-Methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Advances in Cancer Research*.
- Rivera, C. (2015). *Review Article*. 8(9), 11884–11894.
- Rodgers, L. W., Stringer, S. P., Mendenhall, W. M., Parsons, J. T., Cassisi, N. J., & Million, R. R. (1993). Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head & Neck*.
- Rodríguez-Paredes, M., & Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. In *Nature Medicine*.
- S.K.S., H., A.D., K., & S., C. (2011). Oral lichenoid lesions: Clinico-pathological mimicry and its diagnostic implications. *Indian Journal of Dental Research*.
- Scully, C., Langdon, J., & Evans, J. (2012). Marathon of eponyms: 26 Zinsser-Engman-Cole syndrome (Dyskeratosis congenita). In *Oral Diseases*.
- Scully, Crispian. (2013). Oral and Maxillofacial Medicine: The Basis of Diagnosis and Treatment: Third Edition. In *Oral and Maxillofacial Medicine: The Basis of Diagnosis and Treatment: Third Edition*.

- Shack, R. B. (1986). Carcinoma of the tongue and tonsil (oropharynx). *Surgical Clinics of North America*.
- Shafer, W. G., & Waldron, C. A. (1975). Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer*.
- Shaha, A. R., Spiro, R. H., Shah, J. P., & Strong, E. W. (1984). Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *The American Journal of Surgery*.
- Siebold, A. P., Banerjee, R., Tie, F., Kiss, D. L., Moskowitz, J., & Harte, P. J. (2010). Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Sitheeque, M. A. M., & Samaranayake, L. P. (2003). Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 14(4), 253–267.
- Spector, M. E., Wilson, K. F., Light, E., McHugh, J. B., & Bradford, C. R. (2011). Clinical and pathologic predictors of recurrence and survival in spindle cell squamous cell carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*.
- Speight, P. M., & Eng, F. (2018). Oral potentially malignant disorders: risk of progression to. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 125(6), 612–627.
- Spitz, M. R., Fueger, J. J., Newell, G. R., Goepfert, H., & Hong, W. K. (1988). Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. *Cancer*.
- Tan, K., Kajino, K., Momose, S., Masaoka, A., Sasahara, K., Shiomi, K., Izumi, H., Abe, M., Ohtsuji, N., Wang, T., Hino, O., & Fujii, H. (2010). Mesothelin (MSLN) promoter is hypomethylated in malignant mesothelioma, but its expression is not associated with methylation status of the promoter. *Human Pathology*.
- Thomson, P. (2013). Oral Precancer. In *Oral Precancer*.
- Thomson, P. J. (2018). Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 47(9), 803–807.
- Tian, G., Lewis, S. A., Feierbach, B., Stearns, T., Rommelaere, H., Ampe, C., &

- Cowan, N. J. (1997). Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *Journal of Cell Biology*.
- Tian, G., Thomas, S., & Cowan, N. J. (2010). Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity. *Cytoskeleton*.
- Tsai, H. C., & Baylin, S. B. (2011). Cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. In *Cell Research*.
- van der Meij, E. H., Mast, H., & van der Waal, I. (2007). The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncology*.
- Vázquez-Álvarez, R., Fernández-González, F., Gándara-Vila, P., Reboiras-López, D., García-García, A., & Gándara-Rey, J. M. (2010). Correlation between clinical and pathologic diagnosis in oral leukoplakia in 54 patients. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*.
- Verma, M. (2014). Cancer epigenetics: Risk assessment, diagnosis, treatment, and prognosis. *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis*, 1238, 1–799.
- Vyas, J. J., & Desai, P. B. (1981). Multiple primary cancers. In *Indian Journal of Cancer* (Vol. 18, Issue 2, pp. 118–122).
- Wain, S. L., Kier, R., Vollmer, R. T., & Bossen, E. H. (1986). Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: Report of 10 cases. *Human Pathology*.
- Wang, B., Zhang, S., Yue, K., & Wang, X. D. (2013). The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: A report of 275 cases. *Chinese Journal of Cancer*.
- Warnakulasuriya, S. (1987). Semi-quantitative clinical description of oral submucous fibrosis. *Annals of Dentistry*.
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N. W., & Van Der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. In *Journal of Oral Pathology and Medicine*.
- Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, 45(4–5), 309–316.

- Warnakulasuriya, Saman, & Dsc, F. D. S. (2018). Corresponding author : Department of Oral Medicine. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*.
- Wood, N. H., Khammissa, R., Meyerov, R., Lemmer, J., & Feller, L. (2011). Actinic cheilitis: A case report and a review of the literature. In *European Journal of Dentistry*.
- Yadon, A. N., & Tsukiyama, T. (2011). SnapShot: Chromatin remodeling: ISWI. *Cell*, 144(3), 453-453.e1.
- Yeh, I. T., & Ludueña, R. F. (2004). The β II Isotype of Tubulin Is Present in the Cell Nuclei of a Variety of Cancers. *Cell Motility and the Cytoskeleton*.
- ZITSCH, R. P., PARK, C. W., RENNER, G. J., & REA, J. L. (1995). Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*.
- Zykovich, A., Hubbard, A., Flynn, J. M., Tarnopolsky, M., Fraga, M. F., Kerksick, C., Ogborn, D., MacNeil, L., Mooney, S. D., & Melov, S. (2014). Genome-wide DNA methylation changes with age in disease-free human skeletal muscle. *Aging Cell*.

HAM VERİLER

FORMLAR



ETİK KURUL KARARI

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 1180
Konu: Prof. Dr. Semra DEMOKAN hk.

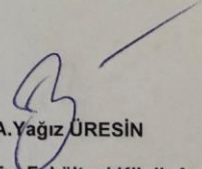
Tarih : 24.09.2019

Sayın Prof. Dr. Semra DEMOKAN
Onkoloji Enstitüsü

İlgi : Onkoloji Enstitüsünün 13/09/2019 gün ve 182636 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Begüm Bürke BULUŞLU' nun yürüteceği 2019/1167 dosya numaralı "Oral Kavitenin Malin ve Premalin Lezyonlarında Tubulin Folding Cofactor D (TBCD) Geninin Genetik ve Epigenetik Profilinin İncelenmesi" başlıklı çalışma, kurulumuzun 20/09/2019 tarih ve 16 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu



PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ORAL KAVİTENİN MALİN VE PREMALİN LEZYONLARINDA
TUBULİN FOLDİNG COFACTOR D (TBCD) GENİNİN GENETİK
VE EPİGENETİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 11	% 6	% 2	% 8
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 6
2	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
5	journals.tubitak.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	epdf.pub İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.istinye.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Begüm Bürke	Soyadı	Buluşlu
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	07.01.1995
Email	begumbuluslu5@gmail.com	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi-Çapa Tıp Fakültesi-Onkoloji Enstitüsü	2020
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2017
Lise	Akşemsettin Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta		Yökdil: 65

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	70,32	68,53	67,32
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
SPSS	İyi
Graph Pad	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):