

KÜBRA GİZEM ESENTÜRK YAYLA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2020



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

(YÜKSEK LİSANS)

**ORAL KAVİTENİN MALİN VE PREMALİN
LEZYONLARINDA *GPRC5C* GENİNİN GENETİK VE
EPİGENETİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ**

KÜBRA GİZEM ESENTÜRK YAYLA

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMRA DEMOKAN**

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

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

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



BEYAN



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

Araştırma konusunun seçimi ve yürütülmesi sırasında değerli bilimsel önerilerinden faydalandığım, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren 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. Gülsüm AK**'a

İstanbul Üniversitesinde Onkoloji Enstitüsü Patoloji Bilim Dalı'ndan Sayın **Doç. Dr. Vakur OLGAÇ**'a

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım **Sena ŞEN, Begüm Bürke BULUŞLU, Metehan KARATAŞ, Fulya KARAYEĞİT, Nadin BEDİKYAN, Işıl Melis ZÜMRÜT, Hüseyin Enes DERYA**'ya,

Tüm eğitim sürecim boyunca maddi ve manevi her zaman yanımda olan, tavsiye ve özverilerini eksik etmeyen sevgili annem **Hatice ESENTÜRK**, babam **Yavuz ESENTÜRK**, abim **Önder Yücel ESENTÜRK** ve eşim **Alper Buğra YAYLA**'ya

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-35403

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iii
BEYAN	iv
İTHAF	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ORAL KAVİTENİN ANATOMİSİ ve KANSER.....	3
2.2. ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM (OSCC)	6
2.2.1. OSCC'nin Epidemiyolojisi.....	6
2.2.2. OSCC'nin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	6
2.2.3. OSCC'nin Evreleme ve Prognoz	7
2.2.4. OSCC'nin Histopatolojisi.....	9
2.2.5. OSCC'nin Klinik Özellikleri ve Tanı-Tedavisi.....	11
2.3. ORAL KAVİTENİN PREMALİN LEZYONLARI (OPML)	13
2.3.1. OPML'in Moleküler Biyolojisi	19
2.4. ORAL KAVİTE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLojİSİ	21
2.4.1. Genetik Değişiklikler	21
2.4.2. Gen-Çevre Etkileşimi ve Epigenetik Değişiklikler ile Biyobelirteç	23
2.5. G Protein-Eşleşmiş Reseptör Sınıf C Grup 5 Üye C (GPRC5C)	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. MATERYAL	29
3.1.1. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Cihazlar	29
3.1.2. Deneylerin Gerçekleştirilmesi Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.1.3. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Kullanılan Kimyasal Karışımlar	30

3.2. YÖNTEMLER	31
3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi.....	31
3.2.1.1. Doku Eldesi.....	31
3.2.1.2. Serum Eldesi	31
3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri.....	31
Dokudan DNA İzolasyonu	31
3.2.3. RNA İzolasyonu İşlemleri	33
3.2.4. cDNA Dönüşümü.....	33
3.2.5. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı	34
3.2.6. Metilasyon Analizi.....	35
3.2.6.1. Bisülfid Dönüşüm	36
3.2.6.2. <i>GPRC5C</i> geninin relatif metilasyon seviyesinin QMSP ile belirlenmesi ...	36
3.2.7. Gen Ekspresyon Analizi.....	38
3.2.7.1. QRT-PCR Yöntemi İle <i>GPRC5C</i> geninin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.8. Veri Analizi	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Demografik ve Klinik Özellikler	40
4.2. <i>GPRC5C</i> Geninin Ekspresyon Analizinin Sonuçları	43
4.3. <i>GPRC5C</i> Geninin Metilasyon Analizinin Sonuçları	59
4.4. <i>GPRC5C</i> Geninin Metilasyona Bağlı Ekspresyon Seviyesinde Azalma.....	62
4.5. Ekspresyon ve Metilasyon Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi	64
5. TARTIŞMA	75
6. KAYNAKLAR	78
HAM VERİLER.....	98
FORMLAR	99
ETİK KURUL KARARI	100
PATENT HAKKI İZNİ	101
TELİF HAKKI İZNİ	102
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	103
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.2.3-1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, Oral Kavite Tümörleri TNM Evrelemesi	8
Tablo 2.2.3-2: Prognostik faktörler.....	9
Tablo 3.1.1-1: Deneylerde kullanılan cihazlar.....	28
Tablo 3.1.2-1: Kimyasal Maddeler.....	31
Tablo 3.1.3-1: Kimyasal Karışımlar.....	31
Tablo 3.2.4-1: cDNA dönüşümünde kullanılan reaksiyon karışımı ve koşulları.....	35
Tablo 3.2.5-1. Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan <i>GPRC5C</i> geninin primer ve prob tasarımı	36
Tablo 3.2.5-2. ACTB geninin primer ve prob dizileri.	36
Tablo 3.2.6.2-1: QMSP reaksiyon karışımı ve koşulları.....	38
Tablo 3.2.7.1-1: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı ve koşulları..	39
Tablo 4.1-1: Çalışmaya katılanların demografik özellikleri.....	42
Tablo 4.1-2: Premalin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri.....	42
Tablo 4.1-3: Malin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri.....	43
Tablo 4.2-1: OSCC/OPML hasta gruplarının tümör, eşlenik normal dokuları ile serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylerin mukoza, serum ve tükürük örneklerinin foldchange değerleri.	50
Tablo 4.2-2: OSCC ve OPML gruplarındaki Tümör-Eşlenik Normal-Sağlıklı Dokularında <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri.	59
Tablo 4.2-3: OSCC ve OPML gruplarındaki Serum-Tükürük örneklerinde <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri.....	59
Tablo 4.5-1: OSCC Hasta Grubu ile Klinik Parametrelerin One-Way Anova/Friedman Analizine Göre p Değerleri.....	70

Tablo 4.5-2: OPML Hasta Grubu ile Klinik Parametrelerin One-Way Anova/Friedman Analizine Göre p Değerleri.....	70
Tablo 4.5-3: OPML hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları...	71
Tablo 4.5-4: OPML hasta grubunun klinik parametrelere göre metilasyon sonuçları...	71
Tablo 4.5-5: OPML hasta grubunun klinik parametrelere göre metilasyon sonuçları...	72
Tablo 4.5-4: OSCC hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları...	73



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1-1: A. Oral kavite ve orofarenksin anatomisi. B, ağzın açık görüntüsü. C, Dilin alt kısmı. (Goldenberg and Koch 2010)	3
Şekil 2.2.4-1: Skuamöz hücre karsinoması.....	11
Şekil 2.2.4-2: Farklı invazyon kalıpları.....	11
Şekil 2.3-1: OPML lezyonları. (A) Eritroplaki / lökoplaki. (B) Ülseratif liken planus.	18
Şekil 2.4.1-1: Oral karsinogenez, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile karakterize edilen karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. OSCC'nin histopatolojik ilerlemesi, hematoksilien-eozin boyasında sunulmuştur	21
Şekil 2.4.2-1: Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesine genel bakış.....	24
Şekil 3.2.2-1: Dokudan DNA izolasyon işlemi.....	33
Şekil 3.2.2-2: Serumdan DNA izolasyon işlemi.....	33
Şekil: 3.2.3-1: Total RNA izolasyonu.....	34
Şekil 3.2.6.1-1. Bisülfıt DNA dönüşüm protokolü	37
Şekil 4.2-1: Hastalara ait örneklerin hedef gen (<i>GPRC5C</i>) ve referans gendeki (<i>ACTB</i>) amplifikasyon eğrileri.....	44
Şekil 4.2-2: Hastalara ait örneklerin hedef gen (<i>GPRC5C</i>) ve referans gendeki (<i>ACTB</i>) amplifikasyon eğrileri analiz aşamasında threshold gösterimi.....	45
Şekil 4.2-3: OSCC hastalarının tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri	45
Şekil 4.2-4: OPML hastalarının tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri	46
Şekil 4.2-5: Sağlıklı tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri	47
Şekil 4.2-6: OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusunun ΔC_t değerlerinin eşlenik normal dokunun ΔC_t değerlerine göre kat değişim(fold change) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri	47

Şekil 2.2-7: OSCC ve OPML hastalarına ait dokularda (tümör ve eşlenik normal doku) relatif olarak hesaplanan ekspresyon düzeylerine ait artma ve azalma sayılarının gösterimi.....	48
Şekil 3.2-8: <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon düzeyleri ile referans genin (<i>ACTB</i>) OSCC ve OPML hastalarına ait tümör (T) ve eşlenik normal (N) doku örneklerindeki sigara ve alkol tüketimine bağlı olarak sağlıklı gruba göre ekspresyon düzeylerindeki azalma katsayımının gösterimi.	49
Şekil 4.2-9: OSCC hastalarının anatomik tutulumuna göre <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon düzeyleri.....	51
Şekil 4.2-10: Premalin hasta grubunun patolojilerine göre <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler.....	52
Şekil 4.2-11: Malin hasta grubunun evrelere göre <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler.....	53
Şekil 4.2-12: Sigara kullanımına göre ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	54
Şekil 4.2-13: Alkol tüketimine göre ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	55
Şekil 4.2-14: OSCC doku örneklerinin ROC analizi	56
Şekil 4.2-15: OSCC vücut sıvı örneklerinin ROC analizi	57
Şekil 4.2-16: OPML doku örneklerinin ROC analizi	58
Şekil 4.2-17: OPML vücut sıvı örneklerinin ROC analizi.....	59
Şekil 4.3-1: Referans genin (<i>ACTB</i>) amplifikasyon eğrileri.....	60
Şekil 4.3-2: Hedef genin (<i>GPRC5C</i>) amplifikasyon eğrileri.....	60
Şekil 4.3-3: Standart curve eğrisi.....	61
Şekil 4.3-4: OSCC ve OPML hastalarının tümör ve eşlenik normal dokularında ve sağlıklı dokuda <i>GPRC5C</i> geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon seviyeleri.....	61
Şekil 4.3-5: OSCC’de metilasyon gözlemlenen hastalara ait bilgilerin gösterimi.	62
Şekil 4.3-6: OPML’de metilasyon gözlemlenen hastalara ait bilgilerin gösterimi	63
Şekil 4.4-1: OSCC hasta grubunda <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin one-way Anava analizi ile gösterimi.....	64
Şekil 4.4-2: OPML hasta grubunda <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve promoter bölgesindeki metilasyon seviyelerinin Anova analizi ile gösterimi.....	64

Şekil 4.5-1: OSCC, OPML ve sağlıklı grupların ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin birlikte Anova analizinin gösterimi.....	65
Şekil 4.5-2: OSCC hasta grubunda GPRC5C geninin ekspresyon seviyeleri ve promoter bölgesinde meydana gelen metilasyon seviyeleri ile differansiyasyon derecelerinin Anova analizinin gösterimi.....	66
Şekil 4.5-3: OSCC hasta grubunun klinik parametrelerinden lenf nodu tutulumu gözlemlenen ve gözlemlenmeyen hastalardaki <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way Anova Analizi ile gösterimi	67
Şekil 4.5-4: OPML hasta grubunun klinik parametrelerinden sigara tüketimine bağlı olarak <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA Analizi ile gösterimi	68
Şekil 4.5-5: OPML hasta grubunun klinik parametrelerinden alkol tüketimine bağlı olarak <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA Analizi ile gösterimi.....	69
Şekil 4.5-6: OSCC hasta grubunun klinik parametrelerinden geç/erken evreye göre, <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA Analizi ile gösterimi.....	70
Şekil 4.5-7: OSCC hasta grubunun klinik parametrelerinden nüks takibine göre, <i>GPRC5C</i> geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA Analizi ile gösterimi.....	71

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

5-FU	: 5-florourasil
AE	: Elution Buffer (Elüsyon tamponu)
ACTB	: Beta Aktin
AJCC	: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Ortak Kanseri Komitesi)
AK	: Aktinik keratoz
ALA	: Aminolaevulinik asit
AW1	: Wash Buffer I (Yıkama tamponu 1)
AW2	: Wash Buffer II (Yıkama tamponu 2)
BCC	: Basal cell carcinoma (Bazal hücreli karsinomu)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
CHD	: Chromodomain-helicase-DNA-binding protein (Kromodomain helikaz DNA bağlama)
CRT	: Chemoradiotherapy (Kemoradyoterapi)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EF	: Ekspresyon Forward
EMT	: Epitel-Mezenkimal Transition (Epitel-Mezenkimal Dönüşüm)
ER	: Ekspresyon Revers
FAM	: 6-florosein amid
GPCR	: G Protein-Coupled Receptor (G protein-bağlı reseptörler)
GPRC5C	: G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member C (G Protein-Eşleşmiş Reseptör Sınıf C Grup 5 Üye C)
HAT	: Histone acetyl transferase (Histon asetil transferaz)
HDAC	: Histone deacetylase (Histon deasetilaz)
HDM	: Histone demethylases (Histon demetilazlar)
HMT	: Histone methyltransferase (Histon metiltransferaz)
HNC	: Head and Neck Cancer (Baş-boyun kanseri)
HNSCC	: (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlar)

HPV	: Human Papilloma Virus (İnsan papilloma virüsü)
HR	: Histolojik risk
HSV	: Herpes Simplex Virus
ICT	: İndüksiyon kemoterapisinin
ISWI	: Yapay SWI
KC	: Keratinosit karsinomuna
LHR	: Lenfositik konak yanıtı
LP	: Liken planus
LNT	: Lenf Nodu Tutulumu
MAL-PDT	: Metil aminolaevulinat PDT
MF	: Metilasyon Forward
miRNA	: microRNA
MR	: Metilasyon Revers
NCDB	: National Cancer Data Base
NuRD	: Nükleozom yeniden modellenmesi ve deasetilasyon
OED	: Oral epitelyal displazi
OL	: Oral lökoplaki
OLP	: Oral liken planus
OmSCC	: Oral mucosal squamous cell carcinoma
OPML	: Oral premalin lezyonlar
OS	: Genel sağkalım (Overall Survival)
OSCC	: Oral Squamous Cell Carcinoma (Oral skuamöz hücreli karsinom)
OSF	: Oral submuköz fibroz
OVC	: Oral verrüköz carsinom
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDT	: Fotodinamik tedavi
PNI	: Perinöral invazyon
PPOEL	: Premalin oral epitelyal lezyonlar
PVL	: Proliferatif verrüköz lökoplaki
QMSP	: Quantitative methylation specific PCR (Kantitatif metilasyon spesifik PCR)
QRT-PCR	: Quantitative real-time polymerase chain reaction (Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)

RNA	: Ribonükleik asit
RT	: Radyoterapi
SCC	: Squamous Cell Carcinoma (Skvamöz hücreli karsinom)
SNF	: Sükroz fermentasyon
SWI	: Pozisyon hasarı
TAMRA	: Karboksitetrametlrodamin
TC	: Tag cluster
TNM	: Primer tümör/bölgesel lenf nodu metastazı/uzak metastaz
UPPP	: Uvulopalatopharyngoplasty (Uvulopalatofaringoplasti)
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
WPOI	: Worst patterns of invasion (En kötü invazyon modeli)

ÖZET

ESENTÜRK, K.G. (2020). Oral Kavitenin Malin ve Premalin Lezyonlarında *GPRC5C* Geninin Genetik ve Epigenetik Profilinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD, Deneysel ve Moleküler Onkoloji BD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Oral kanser, gen-çevre etkileşimini gösteren en iyi kanser modellerinden biridir. Oral Skuamöz Hücreli Karsinoma (OSCC), dünyadaki yıllık baş ve boyun kanseri vakalarının %30'unu ve ağız kanserlerinin %95'ini oluşturmaktadır. OSCC'nin etiyolojik faktörleri arasında bulunan sigara/alkol kullanımı, HPV, UV'nin yanı sıra oral premalin lezyonların (OPML) dönüşümü sonucunda meydana gelir. OSCC ve OPML gelişimde genetik ve epigenetik mekanizmalar etkilidir. Tümörün oluşumu e gelişiminde DNA metilasyonu oldukça etkilidir. Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının TÜBİTAK-114S497 nolu projesinin array sonuçlarına göre metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen, *GPRC5C* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyeleri oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC) ve oral premalin lezyon (OPML) hasta grubunda incelendi. Çalışmamızda, yüksek ve düşük malignite dönüşüm riski taşıyan OPML grupları arasında ve OPML ile OSCC arasındaki moleküler farklılıklar sağlıklı kişilerden elde edilecek verileri karşılaştırarak belirlenmiş ve *GPRC5C*'nin non-invaziv yöntemlerle tanı, teşhis ve tedavide kullanılabilecek bir biyobelirteç olma potansiyeli incelenmiştir. Çalışmamızda, OSCC ve OPML tanısı almış ve ameliyat edilmiş 30'ar hastanın, tümör, eşlenik normal doku, serum ve tükürüğünde, kontrol grubu olarak 15 adet sağlıklı bireyin normal mukoza, serum ve tükürüğünde DNA ve RNA izolasyonları yapıldı. *GPRC5C* geninin metilasyon seviyelerini belirlemek için QMSP yöntemi kullanılmış olup ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde QRT-PCR yöntemi uygulandı. Metilasyon ve ekspresyon oranları belirlenip, metilasyona bağlı ekspresyon kaybı incelendi. Yapılan deneyler sonucunda OSCC grubunda 30 hastanın 4'ünde (%13,33) *GPRC5C* geninin promotör bölgesinde metilasyon, 13'ünde (%43,33) *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyesinde azalma ve 10'unda (%33,33) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlenirken, 7 (%23,33) hastanın ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlemlendi. OPML grubunda 30 hastanın 2'sinde (%6,67) *GPRC5C* geninin promotör bölgesinde metilasyon, 12'sinde (%40) *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyesinde azalma ve 13'ünde (%43,33) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlenirken, 5 (%16,67) hastanın ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlemlendi. OSCC ve OPML hasta gruplarında ekspresyon seviyesindeki değişiklikler ile klinik parametreler (differansiyasyon derecesi, LNT, evre, anatomisi, patolojisi) arasında anlamlılıklar görülmesine rağmen, düşük oranlarda gözlemlenen metilasyonun, değişen ekspresyon seviyeleri üzerinde bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. OSCC ve OPML hasta grubundaki meydana gelen ekspresyon seviyesindeki azalma, oral kavite karsinogenezinde meydana gelen mutasyon kaynaklı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Promoter Metilasyonu, Gen Ekspresyon, OSCC, OPML, *GPRC5C*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-35403.

ABSTRACT

Esentürk, K.G. (2006). Investigation of Genetic and Epigenetic Profile of *GPRC5C* Gene in Malignant and Premalignant Lesions of the Oral Cavity. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Basic Oncology. Master Thesis. İstanbul.

Oral cancer is one of the best cancer models showing gene-environment interaction. Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) accounts for 30% of annual head and neck cancer cases and 95% of oral cancers in the world. It occurs as a result of the transformation of oral premalignant lesions (OPML) as well as smoking / alcohol use, HPV and UV, which are among the etiological factors of OSCC. Genetic and epigenetic mechanisms are effective in OSCC and OPML development. Prof. Dr. According to the array results of the project of Semra Demokan et al., TÜBİTAK-114S497, the methylation and expression levels of the *GPRC5C* gene, whose expression level was decreased due to methylation, were examined in the patient group of oral squamous cell carcinoma (OSCC) and oral premalignant lesion (OPML). In our study, molecular differences between OPML groups with high and low risk of malignancy transformation and between OPML and OSCC were determined by comparing the data obtained from healthy individuals, and the potential of *GPRC5C* as a biomarker that can be used in diagnosis, diagnosis and treatment with non-invasive methods was examined. In our study, DNA and RNA isolations were performed in tumor, conjugated normal tissue, serum and saliva of 30 patients who were diagnosed with OSCC and OPML and in normal mucosa, serum and saliva of 15 healthy individuals as a control group. The QMSP method was used to determine the methylation levels of the *GPRC5C* gene, and the QRT-PCR method was used to determine the expression level. Methylation and expression rates were determined and expression loss due to methylation was examined. As a result of the experiments, methylation in the promoter region of the *GPRC5C* gene was observed in 4 (13.33%) of 30 patients in the OSCC group, decreased expression levels of the *GPRC5C* gene in 13 (43.33%) and increased expression levels in 10 (33.33%) of them. Differences were observed in the expression levels of 7 (23.33%) patients. In the OPML group, 2 (6.67%) of 30 patients had methylation in the promoter region of the *GPRC5C* gene, 12 (40%) had decreased expression levels of the *GPRC5C* gene, and 13 (43.33%) had increased expression levels, while 5 (16%) , 67) observed differences in the expression levels of the patient. Although there were significant differences between the changes in expression level and clinical parameters (degree of differentiation, LNT, stage, anatomy, pathology) in OSCC and OPML patient groups, it was observed that methylation observed at low rates had no effect on varying expression levels. The decrease in the expression level occurring in the OSCC and OPML patient group may be due to mutation in oral cavity carcinogenesis.

Key Words: Promoter Methylation, Gene Expression, OSCC, OPML, *GPRC5C*

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2019-35403.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), dil ve bukkal mukozanın tümörleri dahil olmak üzere baş-boyun skuamöz hücreli karsinomların (HNSCC) çoğunluğunu oluşturur. OSCC, dünyada yıllık gözlenen baş-boyun kanser (HNC) vakalarının %30'unu, oral kanserlerin ise %95'ini oluşturmaktadır. Oral kanserler diğer malin tümörlere göre daha düşük bir insidansa sahipken, yüksek mortalite ve ciddi rahatsızlıklara sebep olabilmektedir. Beş yıllık sağkalım oranı %50 civarındadır; ancak teşhisin geç yapılmasına bağlı olarak bu oran % 15'e kadar düşebilmektedir. OSCC insidansı genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir. Oral kavite kanserleri, gen-çevre etkileşimini gösteren en iyi kanser modellerinden biridir. Sigara ve alkol kullanımı, etnik köken, yaş ve coğrafik bölge gibi etiyolojik faktörler OSCC gelişiminde önemli rol oynamaktadır. OSCC'nin predispozan etiyolojik faktörleri arasında; UV'ye maruz kalma, demir ve çeşitli vitamin eksiklikleri, yüksek doz radyasyon ile immün yetmezliğin yanı sıra viral etkenler (HPV, EBV, HSV), sifilis, kronik iritasyonlar (diş veya protez vurması) ve kötü ağız hijyeni gibi etkenler bulunmaktadır. OSCC, oral kaviteyi kaplayan çok katlı yassı epitelde displazi ile başlayan ve neoplazik hücrelerin bazal membranı aşarak subepitelyal alana invaze olması ile gelişen malin bir tümördür. Dilin ventral yüzeyi ve ağzın zemini, keratinsiz ince epitel ile kaplı olduğu için OSCC'nin en sık görüldüğü bölgelerdir. Karsinojenler ağız tabanında birikirler ve kolayca bu epitelten geçebilirler. Oral premalin lezyonlar (OPML), farklı oranlarda malin transformasyon riski olan hastalıklardır. Premalin lezyonların erken teşhisi oldukça önemlidir; çünkü geç evrelerde, şiddetli displaziye ve karsinoma in situ ve/veya skuamöz hücreli karsinoma dönüşme riskleri oldukça yüksektir. Kanser; hücrenin uyarılma, farklılaşma, yaşam ve ölüm gibi işlevlerini düzenleyen mekanizmalardaki kusurlar sonucunda ortaya çıkan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikiminden kaynaklanan kompleks bir hastalıktır. Epigenetik, genotipik değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olabilen, gen ekspresyonundaki farklılıkları inceleyen bilim dalıdır. Epigenetik mekanizmalar, doğrudan ya da dolaylı olarak gen ifadesini kontrol eden mekanizmalardır. Çevresel etmenlerin genler üzerine etkileri epigenetik mekanizmaların aktive olmasına veya sessizleştirilmesine neden olabilir. Bu da geni inaktive eden bir mutasyon ile benzer sonuçlara sebep olur. DNA dizisi üzerinde kimyasal modifikasyonlar olduğundan kaynaklı geri dönüşümlüdür. Genin promotor bölgesinde lokalize CpG adacıklarındaki sitozin nükleotidinin 5. karbonuna metil grubu eklenmesiyle oluşan DNA metilasyonu, epigenetik gen

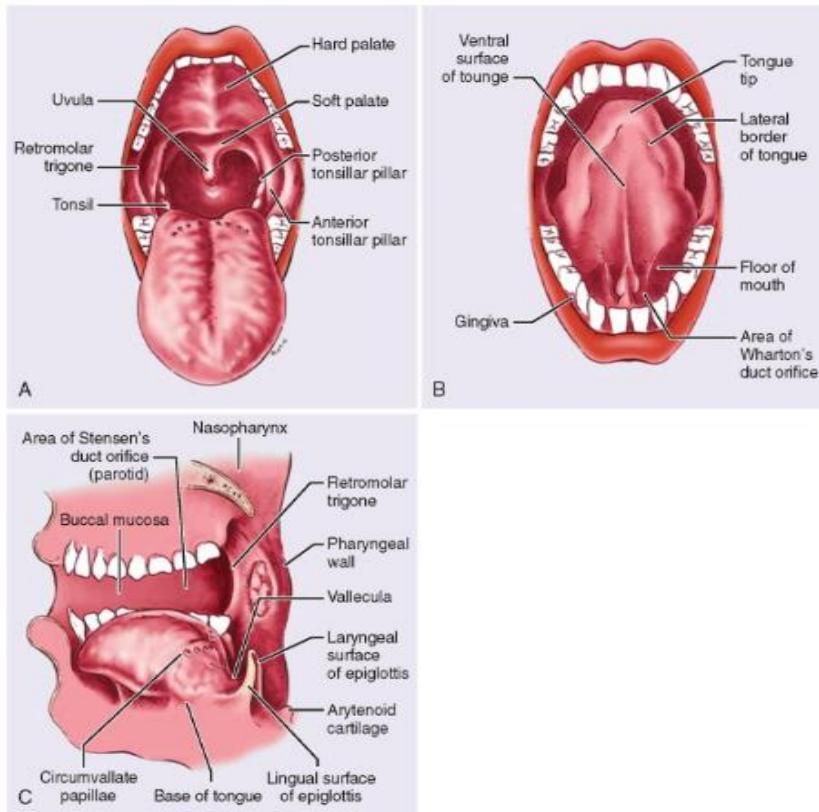
düzenlenmesi için kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiş bir mekanizmadır. Karsinogenezde en fazla görülen epigenetik değişiklik, tümör supressör genlerin promoter bölgelerindeki DNA metilasyonu sonucu gen ifadesinin baskılanmasıdır. Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının yaptığı TÜBİTAK-SBAG-114S497 no'lu çalışmada OPML ve OSCC hastalarının tümör dokuları ile eşlenik normal doku materyalleri ile gerçekleştirilen ekspresyon ve metilasyon array verilerine (Ekspresyon için; logFC:0,59663 p-value: 0,043 Metilasyon için; DeltaBeta: -0,130984561) göre G Protein-Coupled Receptor Class C Group 5 Member C (GPRC5C) geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon nedeniyle metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenmiştir. GPRC5C geni 17. Kromozomun kısa (q) kolunda 25.1 bandında lokalizedir. G protein-bağlı reseptörlerin (GPCR'ler) yapısı, 7 transmembran domaini, hücre dışı bir N-terminal domaini, bir hücre içi C-terminal domaini ve birkaç korunmuş rezidülerden oluşur. Bu proteinin spesifik işlevi bilinmemekle birlikte retinoik asidin G protein sinyal transdüksiyonu kaskadı üzerindeki hücrel etkilerine aracılık edebileceği düşünülmektedir. Araştırmamızda, *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki metilasyon durumu ile ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikleri incelenmiş, sağlıklı popülasyon ile karşılaştırılmıştır. Hastalara ait doku (tümör, eşlenik normal doku) ve vücut sıvı (serum, tükürük) örneklerinde *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki metilasyon, ekspresyon seviyeleri ile metilasyona ve ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin incelenip literatüre katkı sağlanması hedeflenmiştir. OPML ve OSCC'nin erken tanısında ve OPML'nin OSCC'ye dönüşümünde ayırıcı tanısında yeni aday gen biyobelirteç olarak *GPRC5C* geninin kullanılabilirliği test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ORAL KAVİTENİN ANATOMİSİ ve KANSER

Oral kavite; anteriorda dudak vermilyon kenarından başlayarak posterosüperiorda sert damak yumuşak damak bileşkesi, posteroinferiorda sirkümvallat papillalar ve lateralde ise anterior tonsiller plikalar arasında kalan alan olarak sınırları belirlenmiş bölgedir. Dudaklar, dentoalveoler arklar, oral dil, retromolar trigon, ağız tabanı, yanak mukozası ve sert damak olmak üzere 7 bölüme ayrılır.

Oral kavite malinitelerinin lokal, rejyonel ve uzak yayılımını lenfatik yollar, nörovasküler anatomi ve baş boyun fasyal planları etkilemektedir. Fasyal planlar tümörün direkt invazyonunun önüne geçer. Nörovasküler ve lenfatik invazyon olması durumunda hastanın prognozu ve sağ kalımı olumsuz olarak etkilenir (K. J. Lee et al., 2008; Salama et al., 2011).



Şekil 2.1-1: A. Oral kavite ve orofarenksin anatomisi. B, ağızın açık görüntüsü. C, Dilin alt kısmı. (Goldenberg and Koch 2010).

Oral kavite kanserleri, baş boyun kanserlerinin %14 ünü oluşturur (Hoffman, et al. 1998). Oral kavite kanserleri arasında, %86,3 oranında skuamöz hücreli karsinom (SCC), %5,9 oranında adenokarsinom, %2 oranında verüköz karsinom, %1,5 oranında lenfoma ve %1,5 oranında kaposi sarkomu olduğu görüldü. Oral kavite kanserlerinin tanısında %55 oranında erken evre tümörlerinin olduğu saptanmıştır. Dil bölgesinde anatomik tutulum gösteren tümörlerde 35 yaş altı hastaların daha sık görülürken, ağız tabanı bölgesinde tutulum anatomik gösteren tümörlerin daha seyrek oranda görüldüğü belirtilmiştir (Funk et al. 2002).

Oral kavite kanserlerinde SCC varyantları bulunmaktadır. Sarkomatoid SCC olarak bilinen iğsi hücreli SCC, oral kavite, larenks ve orofarenkste görülmektedir (Spector et al., 2011). Bazaloid karsinom, SCC'nin yüksek dereceli varyantı olarak görülmekte ve 5 yıllık sağ kalım oranı, orta ve kötü diferansiye oral kavite SCC'leri ile benzerdir (De Sampaio Góes et al. 2004). Egzofitik olarak büyür ve lokal invazive olan Verrüköz karsinom SCC'nin düşük dereceli varyantı olarak kabul edilmekte ve sıklıkla bukkal mukozada görülmektedir (%50). Rejyonel yayılım ihtimali düşük olan bu variant türü, radyoterapi dirençli olarak kabul edilir ve tedavisi cerrahidir (De Sampaio Góes et al. 2004).

Oral kavite kanserleri, dudak, inferior alveoler arkus, dil, retromolar trigon, ağız tabanı, bukkal mukoza ve sert damak olmak üzere 7 anatomik bölgede görülmektedir.

Dudak tümörleri, SCC baskın olduğu alt dudak (%88-95), bazal hücreli karsinomun baskın olduğu üst dudak (%2-7) ve komissürde (%1) görülmektedir. Vermilyon veya deri üzerinde ülser lezyon olarak karşımıza çıkan dudak tümörlerinin risk faktörleri arasında güneş ışığı maruziyeti, açık ten, sigara kullanımı ve immünsüpresyon bulunur. Boyun metastazı dudak tümörlerinde sık olarak görülmez (%10) ve hastaların çoğu erken evrede teşhis edilir (Weber et al. 2006). Perinöral invazyon, üst dudak lezyonları, kemik tutulumu, lenf nodu metastazı, cilt tutulumu ve komissür lezyonları kötü prognostik faktörlerdir (Zitsch et al., 1995).

Inferior alveolar arkus anatomik bölgesinde tutulum gösteren tümörler, oral kavite SCC'lerinin %10'unu kapsamaktadır. Alt alveoler inferior tümörleri üst alveoler inferior tümörlerinden daha sık görülmektedir. Mukozanın altta kemiğe yakın olması nedeniyle tanı esnasında kemik invazyonu sık olarak görülür. Diş soketlerine uzanan tümörler daha fazla kemik invazyonu ile ilişkilidir. 155 hastanın olduğu bir çalışmada, Alveoler inferior tümörlerinin %63 oranında mandibula gövdesinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Lezyonların yarısından çoğu adenoidizasyon hastalarında ortaya çıkmış olup %67 hastada erken evre (T1-2) tümör

saptanmıştır (Eicher et al., 1996). Yapılan çalışmalarda mandibula invazyonu açısından BT'nin spesifik ve duyarlı bir tetkik olduğu belirtilmiştir (Close et al., 1986). Metastatik yayılımı olmayan hastalarda 5 yıllık survi T1-2 tümörlerde %85, T3-4 tümörlerde %65 olarak belirtilmiştir (Overholt et al., 1996).

Dil, nonkeratinize skuamöz epitel ile kaplı kas dokusudur. Dil; lateral dil, ventral ve dorsal dil, anterior tip alt bölümlerini içerir. Dil anatomik bölgesinde tutulum gösteren tümörler, epitelde ortaya çıkar ve kaslara invaze olur. En sık, ağrılı ülserasyon ve egzofitik kitle olarak karşımıza çıkar. Genel olarak sigara ve alkol kullananlarda altı ve yedinci dekatlarda ortaya çıkar. Çoğunluk SCC olup dilin genelde posterolateral (%75) kısmında ortaya çıkar. İkinci en sık görülen yer anterolateral ventral yüzdür. Dorsal yüzde tümör nadir görülür (Goldenberg et al. 2000).

Retromolar trigon anatomik bölgesinde tutulum gösteren tümörler, ileri evre hastalık olarak ortaya çıkma eğilimindedir. Hastaların %50'sinde tanı sırasında lenf nodu metastazı görülür. Tümörün dil kökü ve tonsiller fossaya yayılımı yaygındır. Mandibula tutulumu sık olduğundan erken evre tümörlerde bile mandibulanın bir kısmını rezeke etmek gerekir. T1 hastalıkta 5 yıllık sağ kalım % 76 iken T4 hastalıkta %54 olarak belirtilmiştir (C. J. Huang et al. 2001).

Ağız tabanında anatomik tutulum gösteren tümörler, tipik olarak altıncı dekatla ve çoğunlukla erkeklerde ortaya çıkar. Tanı esnasında %35'i ileri evrede (T3-4) saptanır (Shaha et al., 1984). Ağız tabanını destekleyen mylohyoid, genioglossus ve hyoglossus kasları, hastalığın yayılmasında bariyer görevi görürler. Ağız tabanı kaslarının tutulması sonucunda dilde hipomobilité ve dizartri veya dilde fiksasyon ile ortaya çıkabilir. (Rodgers et al. 1993; Shack 1986).

Bukkal mukoza anatomik bölgesinde tutulum gösteren tümörler, tüm oral kavite malignitelerinin %10'unu temsil eder ve erkeklerde 4 kat daha fazla görülür. Tütün ürünlerinin kullanımına bağlı olarak ortaya çıkar. SCC varyantı olan verrüköz karsinom en sık bukkal mukozada görülür. Düşük dereceli bir tümör gibi görülse de farklılaşma ve invazyon noktaları olabilir. Anteriorda bulunan lezyonlar submandibuler nodlara metastaz yaparken posterior lezyonlar üst jugulodigastrik nodlara metastaz yapar. 5 yıllık survi evre 1 hastalıkta %75-78, evre 2 %65-66, evre 3 %30-62, evre 4 hastalıkta ise %20-50 olarak bildirilmiştir (Jing et al., 2006),(Diaz et al., 2003).

Sert damak anatomik bölgesinde tutulum gösteren tümörlerde, SCC en sık görülen malignitesidir. SCC dışında minör tükrük bezi karsinomları da görülmektedir. Kaposi sarkomunun oral kavitede en sık olarak görüldüğü yer sert damaktır (Beckhardt et al. 1995), Damak kemiğinin periostu tümörün yayılımı için bir bariyer görevi görür. Periostun tutulumu kemiğin bir kısmının eksizyonunu gerektirir. Yapılan bir çalışmada T1 tümörlerde lenf nodu metastazı %4,1, T2 tümörlerde %14,9, T3 tümörlerde %10,3 ve T4 tümörlerde %24,7 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle T1 dışındaki tümörlerde boyun disseksiyonu önerilmektedir (H. W. Lin and Bhattacharyya 2009).

Çalışmamızda yer verdiğimiz OSCC grubunu oluşturan 30 hastanın 5'i ağız, 6'sı bukkal mukoza, 10'u dil, 3'ü inferior alveolar arkus, 4'ü retromolar trigon, 2'si sert damak anatomik bölgesinde tutulum göstermektedir.

2.2. ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOM (OSCC)

2.2.1. OSCC'nin Epidemiyolojisi

Oral kanserler, Güney Asya ve Pasifik Adaları'nda erkeklerde daha çok görülen bir kanser türü olup ölüm nedenini olarak da sıkça görülmektedir (Bray et al. 2018). Hindistan, dünyada oral kanserlerin üçte birini oluşturmaktadır. OSCC, tüm oral malign lezyonların %90'ından fazlasını oluşturmaktadır.

OSCC'nin coğrafik dağılımına göre en yüksek insidans oranları Doğu'dan Orta Asya'ya, Büyük Rift Vadisi boyunca Afrika'nın Hint Okyanusu kıyısına ve Uruguay'daki Güney Amerika'da ve tüm Gaucho Bölgesi'nde kayıtlıdır. Özofagus kanseri oranları Çin'de 10 kat değişebilmektedir ve kısa coğrafi mesafelerde farklılıklar vardır. OSCC, en sık ölüm nedeni Kuzey Merkez Taihung Dağ bölgesinde görülmektedir. Büyük nüfus ve yüksek insidans nedeniyle, Çin dünya çapında toplam OSCC vakalarının yaklaşık yarısını oluşturmaktadır (Khan et al. 2019).

2.2.2. OSCC'nin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Tütün kullanımı, oksidatif enzimler yardımıyla DNA ile etkileşime girebilen reaktif metabolitlere dönüştürülen yaklaşık 300 kanserojen bileşiğin salınmasına neden olmaktadır (Vargas-Ferreira et al. 2012). Literatürde bulunan derlemelerde, tütsülenmiş veya dumansız tütün maruziyeti ile OSCC arasındaki ilişkiyi güçlü bir şekilde desteklemektedir. (Awan and Patil 2016; D. N. Sinha, Abdulkader, and Gupta 2016; Q. L. Wang et al. 2017). Dumansız tütün ürünleri, sigara içenlerin ve sigara içmeyenlerin oral sıvılarında bulunan nitrozaminler

gibi birkaç kanserojen içermektedir (K.Warnakulasuriya & Ralhan, 2007).On yıllık sigara bırakma süresi olan kişilerde, ağız kanseri riski, sigara içmeyenler ile benzer seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Bosetti et al. 2008; Saman Warnakulasuriya et al. 2010).

OSCC'de risk sinerjik olarak tütün tüketimi ile ilişkili görünmektedir ve günlük içecek sayısı yerine genel alkol tüketimi ile bağlantılı görünmektedir (Lubin et al. 2009). Etanol, üst gastrointestinal sisteminden emilerek, alkol dehidrojenaz 1B ile karaciğerde asetaldehide metabolize edilir ve aldehid dehidrojenaz 2 ile ardışık detoksifikasyon ile asetik aside dönüşmektedir. Asetaldehit, maya ve bakteri gibi mikroorganizmaların etanol ile etkileşimiyle insan ağız boşluğunda da üretilmektedir (Khan et al. 2019).

Epitelyal hücre özgülüğüne sahip olan, konakçıya özgü DNA taşıyan ve konakçı hücresel genom içine yerleştirme yeteneği olan HPV'ler, OSCC'de tanımlanan en yaygın virüs türüdür (Termine et al., 2008). OSCC'de, HPV virüsünün yaygınlığı öncelikle demografi ve etnik köken farklılıkları nedeniyle %20-25 arasında değişmekte olduğu belirtilmiştir (Vargas-Ferreira et al., 2012). Ayrıca, Herpes Simplex Virus (HSV) I antikorlarının seviyesi baş-boyun kanseri tanılı sigara içen hastalarda, sağlıklı fakat sigara içenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. HSV'ye uzun süre maruz kaldığında mukozanın tütün kanserojenlerine karşı daha duyarlı hale getirebileceğini düşünülmektedir (Khan et al. 2019).

Meyve ve sebze tüketimi, düşük orada da olsa ağız kanseri ile ilişkilendirilmiş ve meyve, sebze ve lif bakımından zengin yiyeceklerin koruyucu bir rol oynayabileceği gösteren kaynaklar literatürde bulunmaktadır (Soodan KS, Priyadarshni P 2018). Haftada birden fazla tüketilen sarı sebze, turpgiller ve narenciye'nin koruyucu bir etkisi olduğu gösterirken, haftada birden fazla tüketilen kırmızı etin risk oluşturduğu bildirilmiştir (B. Gupta, et al. 2017).

2.2.3. OSCC'nin Evreleme ve Prognoz

Oral kavite malignitelerinde evreleme American Joint Committee on Cancer tarafından tanımlanır (AJCC) ve primer tümör, bölgesel lenf nodu metastazı, uzak metastaz (TNM) formatını izler (Tablo 2.2.3-1).

Tablo 2.2.3-1: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8.edition, Oral Kavite Tümörleri TNM Evrelemesi

(T:Primer lezyonu(tümör boyutu ile çevre dokulara infiltrasyon derecesi baz alınarak değerlendirilir), N:Bölgesel lenf nodu tutulumunu, M:Uzak metastaz).

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

Bilateral olan dilin arka bölümünün lenfatik drenajıdır, dilin ön bölümü ise tek taraflıdır ve genel olarak servikal lenf nodunun üst bölümünde tutulum gösterirken arka bölümü daha aşağıya tutulum gösterir. Lenf nodunun üst bölümünün tutulumunun, alt bölümün tutulumundan daha iyi prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir (Omar 2013). Arka bölümde tutulum gösteren orofaringeal tümörlerde oral tümörlere kıyasla beş yıllık sağ-kalım önemli ölçüde azalmadığı belirtilmiştir (Scully and Bagan 2009). Nodal metastaz üzerindeki etkisi olan tümör yerleşimi sağkalımda azalmaya neden olur (Woolgar 2006). Prognoz, tümör primer bölgesine, lenf nodu tutulumuna, tümör kalınlığına ve cerrahi sınırların durumuna ek Tablo 2.2.3-2’de belirtilen faktörlere göre değişmektedir (Garzino-Demo et al., 2006). Tümörün tutulum gösterdiği bölge ve boyutu genellikle tedavinin seçimini ve sonucunu etkilemektedir (Scully and Bagan 2009). Tümör boyutunda meydana gelen artış, servikal tutulum (Woolgar, 2006), yüksek nüks oranı (Woolgar, 2006) ve kötü prognoz (Crissman et al., 1984) ile ilişkilendirilmiştir. Bukkal mukoza anatomik bölgesinde tutulum gösteren OSCC tümör kalınlığının 6 mm veya daha fazla olması durumunda kötü prognoz düşünülmelidir (Urist et al. 1987). Önemli bir caydırıcı etken ise lenf nodu tutulumunun boyutudur. Erken evre tümörlerinde (T1/T2) gizli lenf nodu metastazı insidansının %27-40 arasında olduğu bildirilmiştir (Keski-Säntti et al., 2006). Tümör hücrelerinin sinir kılıfı boyunca yayılması, genel prognozu-sağkalımı etkilemektedir (Scully and Bagan 2009). Prognostik değeri çeşitli çalışmalarda vurgulanan ve bölgesel nüks ve uzak metastaz ile bağlantılı olan perineural-endonöral invazyon, tümör hücreleri sinir ve çevre dokulara kolayca yayıldıkça tümör hücrelerinin kafatasının tabanına yayılması anlamına gelmektedir (Omar 2013).

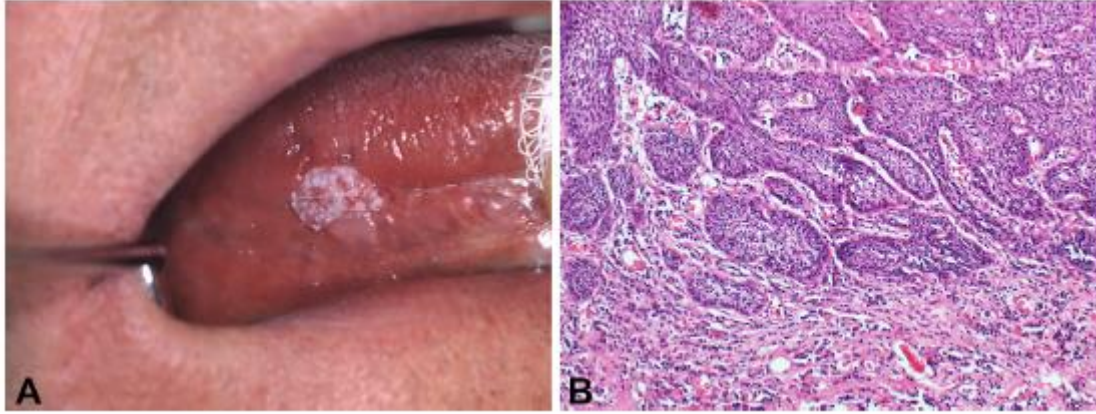
Tablo 2.2.3-2: Prognostik faktörler

Prognostik Faktörler			
Yaş	Sosyo-Ekonomik Durumu	Meslek	Yaşam Tarzı
Tolerans	Hastanın Genel Durumu	Cinsiyet	Preoperatif Hemoglobin Düzeyi

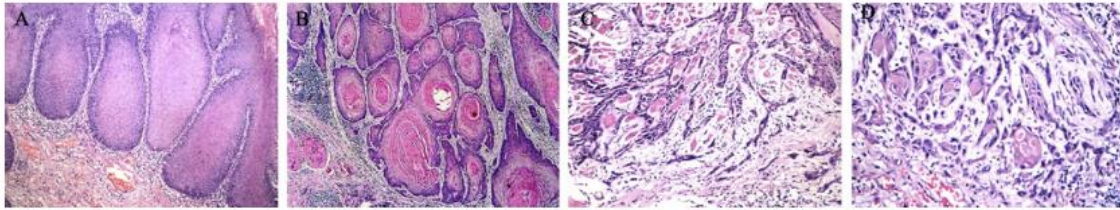
2.2.4. OSCC’nin Histopatolojisi

TNM sınıflandırmasına ve tümörün konumuna bağlı olarak hastalığın klinik evrelendirilmesi rutin olarak oral skuamöz hücreli karsinomların (OSCC’ler) prognozu ve tedavisi için ana kriterlerdir (Dissanayaka et al. 2012). OSCC’li hastalarda tedaviye yanıt ve

prognoz farklılık gösterebilir. Aynı bölgede tutulum gösteren tümörlerde ve aynı klinik aşamada olan farklı hastaların bazılarında uzun süreli sağkalım görülürken, bazı hastalarda ise hızla metastaz görülebilir ve sağkalım süreleri azdır (Brandwein-Gensler et al., 2005). Bu nedenlerden dolayı, OSCC'nin spesifik histopatolojik sınıflandırma sistemlerine sahip olması, klinisyenlere OSCC hastalarının tedavisinin kişiselleştirilmesinde ve tanı konulmasında yardımcı olabileceği öne sürülmüştür (Almangush et al., 2015). OSCC'ler için ilk histopatolojik derecelendirme sistemi, daha sonra Dünya Sağlık Örgütü (WHO) için kabul edilen 1920 yılında Broders (Broders, 1920) tarafından geliştirildi. Bu sistemde, tümörün keratinizasyon derecesi, hücresel ve nükleer pleomorfizm seviyeleri ve mitotik aktivitesinin varlığı hesaba katılmamıştır (Gueiros et al., 2011). Daha sonraki yıllarda, OSCC'ler için başka birçok histopatolojik derece sistemi öneren Bryne ve ark., derin invaziv marınların malinite derecelendirmesi, keratinizasyon, nükleer polimorfizm, invazyon paterni ve lenfoplazmasitik infiltrasyon derecesini derecelendiren bir sistem oluşturmuşlardır (Bryne et al. 1992). Benzer şekilde, Brandwein-Gensler ve ark. tarafından önerilen histolojik risk (HR) modeli; en kötü invazyon modeli (WPOI), lenfositik konak yanıtı (LHR) ve perinöral invazyon (PNI) olmak üzere üç histopatolojik parametre kullanılarak cerrahi örneklerin değerlendirilmesine dayanmaktadır (Brandwein-Gensler et al. 2005). Bu model OSCC'ler için anlamlı öngörücü güç önermesi ve genel sağkalım gösterdiği literatürde bulunan çalışmalarda gösterilmiştir (Brandwein-Gensler et al., 2010; Lindenblatt et al., 2012; Y. Li et al., 2013; P. Sinha et al., 2015; Vered, Dayan, et al., 2010a; Vered, Dobriyan, et al., 2010b). Son zamanlarda, Almangush ve arkadaşları (2015) BD modelini olarak tanımlanan, tümör tomurcuklanması (B) ve milimetre cinsinden tümör invazyonunun derinliği (D) olmak üzere iki parametreye tanıtmıştır (A. Almangush et al. 2015). İnvaziv cephede tek bir kanser hücresinin veya küçük <5 kanser hücresi kümesinin varlığı olarak tanımlanan tümör tomurcuklanması (C. Wang et al. 2011), lokal-bölgesel rekürrens riski ve OSCC'ler için kısaltılmış sağkalım ile ilişkili öngörücü özellikler göstermiştir (Alhadi Almangush et al., 2014). Tümör invazyonunun derinliği OSCC'ler için önemli bir prognostik parametre olarak tanımlanmıştır ve 4 mm'lik kesme noktası OSCC'lerin tedavisi ve prognozu için en önemli belirteç olan lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (S. H. Huang et al., 2009). Histopatolojik olarak, tümörler, bazal membrandan ve alttaki bağ dokusu, kas veya kemiğe nüfuz eden invaziv adaların ve malign skuamöz epitel hücrelerinin kordonlarının varlığı ile karakterizedir. Bu tümör hücreleri, ana hücrelerine benzerliklerine ve üretilen keratinin fonksiyonuna göre derecelendirilmektedir (Chi, Day, and Neville 2015).



Şekil 2.2.4-1: Skuamöz hücre karsinoması. A, Maksiller mukozayı içeren ekzofitik bir nodüler kitle. B, Histolojik incelemede keratinizan skuamöz epitelyumla kaplı mukozal bir elips görülmektedir. Epitel, yaygın olarak kronik şekilde iltihaplanan bir bağ dokusu lamina propriaya nüfuz eden yassı kaynaklı neoplastik hücrelerin tabakaları, yuvaları ve kordonları ile akantotiktir. Neoplastik süreç orta derecede iyi farklılaşmıştır (Maymone et al. 2019).



Şekil 2.2.4-2: Farklı invazyon kalıpları. A, Geniş itme sınırı (evre 1). B, Pushing adaları (evre 1). C, Sızan tümörün ince telleri (evre 2). D, Arabirime sızan bireysel tümör hücreleri (evre 3). (Dissanayaka et al. 2012)

2.2.5. OSCC'nin Klinik Özellikleri ve Tanı-Tedavisi

Oral mukozal skuamöz hücre karsinomu (OmSCC) genellikle dudak vermilyonunun SCC'sinden ayrılır, çünkü omSCC, dudagın SCC'sine kıyasla daha agresif bir prognoz gösterir ve dudagın SCC'sinin baş - boyun deri SCC'sine kıyasla daha kötü bir prognozu vardır (Bota, Lyons, and Carroll 2017). OmSCC klinik olarak lökoplaki, eritroplaki, eritroleukoplaki veya nodüler bir kitle olarak ortaya çıkabilmektedir (Maymone et al. 2019). OSCC çoğunlukla dilin posterior lateral sınırında tutulum göstermesinin yanı sıra, ağız tabanı, yumuşak damak, diş eti, bukkal mukoza ve sert damakta da tutulum göstermektedir (Chi, Day & Neville, 2015). Dilin OmSCC'si OSCC'lerin yaklaşık %50'sini temsil etmektedir (Chi, Day, and Neville 2015). OmSCC sınıflandırması ve prognozu tümör, düğüm ve metastaz evrelemesine

dayanmaktadır (Rhodus, Kerr, and Patel 2014). Oral verrüköz karsinom (OVC), lokal agresif olabilen (Sharma, et al., 2016) ancak düşük metastaz olasılığı olan düşük dereceli (Peng, et al., 2016), iyi diferansiye bir OSCC çeşididir ve çakıllı veya karnabahar benzeri dokulu bir yüzeye sahip ekzofitik lezyonlardır (Sonalika & Anand, 2016). HPV alt tipleri 16 ve 18, OVC'li hastalarının yaklaşık % 40'ında pozitif bulunmuştur. Tütün ve alkol kullanımı önemli risk faktörleri arasındadır (Fu et al. 2017). OVC prevalansı tüm oral karsinomların % 2-12'si arasında değişmektedir (Chi, Day, and Neville 2015). OVC'ler en yaygın olarak bukkal mukoza (Hosseinpour, et al. 2017) mandibular vestibül, dişeti (Peng et al., 2016), dil ve sert damakta tutulum gösterirler (Komal, et al., 2015;). Lezyonlar tipik olarak yavaş yavaş gelişmektedir, bazal membrana invazyon olmadan ve sporadik lokal ve distal tutulum gösterdiğini belirten çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Farhi and Dupin 2010; Hosseinpour, Mashhadiabbas, and Ahsaie 2017; Komal, Deshmukh, and Deshmukh 2015; Staines and Rogers 2017). OmSCC'nin tedavisi tümör, lenf nodu ve metastaz evrelemesi tarafından yönlendirilir ve geniş cerrahi eksizyon, boyun diseksiyonu, radyasyon tedavisi, kemoterapi veya daha yaygın olarak cerrahi ve yardımcı tedavinin bir kombinasyonunu içermektedir (Machado, et al., 2016).

OSCC'nin tedavisi, evresi, hastanın genel sağlığı ve tümör dokusunun bulunduğu yer gibi faktörlerle ilişkilidir. Erken evrede tanı konulan oral kanser hastalarında kullanılan standart olan yöntemler arasında radyoterapi (RT) veya cerrahi yöntemleriyle tek hat tedavi bulunurken, ileri evrede tanı konulan ya da evresi ilerlemiş olan kanser hastaları için cerrahi ve/veya kemoradyoterapi (CRT) yöntemlerinin ortak kullanımı ilk uygulanan tedavi yöntemlerindendir. Günümüzde hastalarda OSSC'yi kontrol altına almak için kombine tedavi, tamamlayıcı tedavi ve profilaktik tedavi daha fazla kullanılmaktadır (Gharat et al. 2016). OSCC'de, tümör boyutunun küçük olduğu vakalarda, cerrahi tedavi yöntemi tercih edilmemektedir (Lagergren et al. 2017).

OSCC'nin kemoterapi tedavi yöntemleri arasında, cisplatin (Pendleton and Grandis 2013), karboplatin, 5 - florourasil (Freeman et al. 2015), metotreksat (Chakraborty, et al., 2014) ve taksanlar (paklitaksel (Ledwitch et al. 2013) ve dosetaksel (Caponigro, et al., 2009)) gibi ilaçlar bulunmaktadır. Son yirmi yılda bu tür terapiler, genel sağkalım (OS) seviyesinde önemli bir artış göstermediği görülmüştür. Oral kanseri nüksünde, tümör dokusuna daha yüksek doz vermek için standart tedavinin ardından ardışık tedavi için sisplatin ile intraarteriyel BT yönteminin kullanılabileceği düşünülmüştür (Eder-Czembirek, et al., 2018). İndüksiyon kemoterapisinin (ICT), uzak kontrolü iyileştirildiğinde genel sağkalım,

progresyonsuz sağkalım ve hastalıksız sağkalımı artıracacağı varsayılmıştır (Busch, et al., 2015). ICT ile kesin tedaviden önce tümör hacmindeki küçülme, radyasyon ve cerrahinin deforme edici etkilerini azaltırken, RT fizibilitesi ve tolere edilebilirliği artırabileceği düşünülmektedir.

2.3. ORAL KAVİTENİN PREMALİN LEZYONLARI (OPML)

Oral kavitenin potansiyel olarak kötü huylu bozuklukları (OPML), oral bölgede meydana gelen hücresel atipi ve yapısal bozulmalarını içeren invaziv kansere dönüşüm riski fazla, heterojen bir mukozal epitelyal değişikliklerdir (Iocca et al. 2019). Bununla birlikte, lökoplaki ve eritroplaki, klasik olarak displastik değişikliklerle ilişkili lezyonlardır. Dolayısıyla beyaz, kırmızı veya karışık beyaz ve kırmızı değişiklikler epitelyal displaziye en sık ortaya çıkarılan değişikliklerdir. Çok katlı yassı epitel tabakada displazik değişiklikler sık rastlanmaktadır. Displazik değişiklikler ilk olarak serviks epitelinde tanımlanmıştır ve servikal lezyonlar, epitel displazili oral lezyonların displazi olmayanlara göre daha sık karsinoma geliştiği bulgularına dayanıyordu (Richart and Barron 1969). Oral mukozada görülen OPML; yassı epitel hücreli karsinomdaki tümör hücresine benzerlikleri dolayısıyla, OSCC'ye dönüşme eğilimini göstermekte olduğu bildirilmiştir (Reibel 2003)

WHO tarafından yapılan, OPML sınıflandırma sistemi patologlar tarafında kullanılarak lezyonların objektif şekilde değerlendirilmektedir (Speight, Khurram, and Kujan 2018). Lökoplaki (LE), liken planus (LP), oral likenoid lezyonlar (OLL), oral submukoz fibroz (OSF) ve proliferatif verrüköz lökoplaki (PVL) ve eritroplaki (EP) klinik uygulamada en sık karşılaşılan OPML'ler arasındadır (Ganesh et al. 2018). OPML, genetik/çevresel olabilen çok sayıda etiyolojik faktör ile ilişkilidir. Tütün, alkol ve betel çiğneme, çoğunlukla belirli lezyonların gelişmesiyle ilişkilendirilmiştir (Iocca et al. 2019). OLL, son zamanlarda LP'ye çok benzer bir patolojik lezyon olarak tanımlanmış, ancak sıklıkla tanımlanabilir bir etiyolojik faktör (örneğin, dental amalgam restorasyonu) ile ilişkilendirilmiştir. Etiyoloji ve sunum tarzındaki heterojeniteden bağımsız olarak, OPMD tanısı klinik belirtilere ve histopatolojik incelemeye dayanır (Mello et al. 2018). Teşhis konulduktan sonra, OPMD'ler, invazif skuamöz hücreli karsinomaya dönüşme içsel potansiyelleri nedeniyle klinik bir zorluk oluşturur ve bu nedenle uygun takip ve tedaviler düşünülmelidir. Sürekli olarak tütün kullanımı ve alkol tüketimiyle ilişkilendirilen LE, oral mukozada yaygın olarak tutulum gösteren potansiyel bir malinedir (Thompson 2006).

Durdurulamayan bir lezyon olan LE, beyaz renklidir, geri dönüşümsüzdür ve malin transformasyonu yüksektir (Maymone et al. 2019) (Şekil 2.3-1). Homojen lezyonlar beyaz,

yüzeysel ve düz olarak belirgin sınırlarla birlikte görünürken, homojen olmayan LE lezyonları, daha önce benekli kırmızı ve beyaz düzensiz lezyon olarak bilinen eritroleukoplaki ile karakterize edilebilir (Monteiro et al. 2017; Staines and Rogers 2017). LE oral mukozanın her hangi bir bölgesinde gelişim gösterebilmektedir. Multifokal LE türü olan proliferatif verrüköz lökoplaki (PVL), agresif bir davranış gösterir. PVL, genellikle verrüköz, keratotik yüzeye sahiptir ve asemptomatik, homojen olmayan beyaz plaktan oluşmaktadır. Lezyonların en çok tutulum gösterdiği bölgeler dişeti, bukkal mukozaya, alveollerken en az dilde tutulum gösterir. OL, tütün kullanımı ve alkol tüketimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Shanbhag 2017; Staines and Rogers 2017). Literatürde insan papilloma virüsü (HPV) ile nedensel ilişkisi olduğunu tanımlayan çalışmalar bulunmaktadır (Jose V. Bagan et al., 2007; R. O. Greer et al., 1990). 40 yaşın üstündeki erkeklerde daha sık bulunan OL'nin genel popülasyondaki prevalansı yaklaşık %2'dir ve yaşa bağlı olarak yaşlı popülasyonlardaki prevalans oranları daha fazladır. Biyopsi örneğinin histolojik incelenmesiyle OL tanısı konulabilir. Tedavi ve önleme tütünün bırakılması, kemoprevensiyon ve cerrahi eksizyonu içerir (J. Bagan et al., 2010; Capella et al., 2017).

Pürüzsüz bir histopatolojiye sahip olan eritroplaki (EP), eritematöz oral mukozal lezyon ile karakterize edilir ve yüksek oranda malin dönüşümü özelliği taşır (Hosni et al., 2009; Yang et al., 2015). Oral mukozanın, soliter (Boy 2012; Reichart and Philipsen 2005) eritematöz bir lezyonu olan EP'nin risk faktörleri arasında, sigara/alkol kullanımı ve yüksek risk oluşturan HPV varlığı bulunmaktadır (Hashibe et al. 2000). PVL dışında, OSCC'lerin %85-90'ı başlangıçta eritroplaki olarak bulunmaktadır (Boy 2012; Yang et al. 2015). Oral kanserler için yüksek risk oluşturan HPV enfeksiyonuna sahip olan hastalarda eritroplaki gelişim riski, HPV enfeksiyonuna sahip olmayan hastalara göre 3-4 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Reed and Wahlquist 2015). Eritroplakini en çok tutulum gösterdiği bölgeler, yumuşak damak (Reichart and Philipsen 2005), dilin ventral yüzeyi (Villa & Abati, 2011) ve ağız zeminidir (Yang et al., 2015) ve genellikle başka semptom ile ilişkili değildir (Villa, Villa, and Abati 2011). Yüksek malign dönüşüm oranı gösteren eritroplakide erken tedavi önerilmektedir (Hashibe et al. 2000). Tedavisinde ise mikroskopik inceleme ile bakıldıktan sonra epitelyal displazi gösteren lezyonlarının tam eksizyonu ile eksizyonel veya insizyonel biyopsi alınmasını içerir (Tan et al., 2011; Yang et al., 2015). Orta derecede displazi gösteren veya displazi göstermeyen lezyonların tedavisinde sürekli izleme önerilmektedir. lezyonun boyutu 80 mm² den büyük olduğunda rekürrens için belirleyici olduğu bildirilmiştir (Yang et

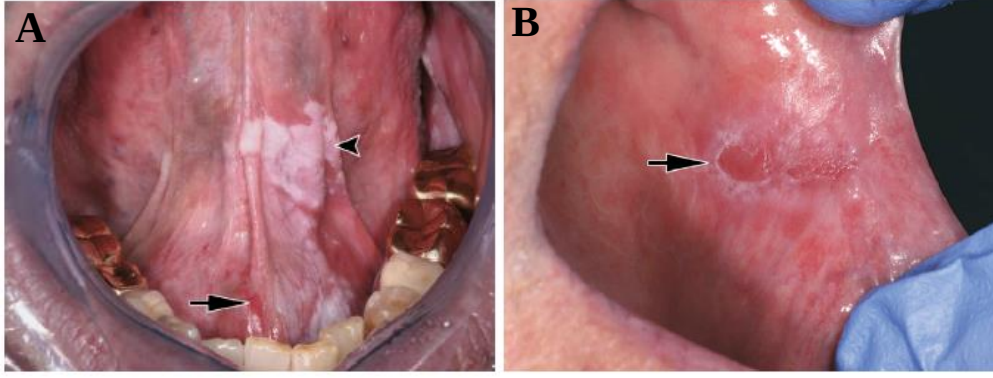
al. 2015). Displazi alanları OPMD lezyonlarıyla ilişkili bulunabilir veya bulunmayabilir, bu olduğunda genellikle eritroplaki bölgelerinde bulunur (Porter et al., 2018).

Liken planus (LP), genel popülasyonun %1 ila %2'sini etkileyen (Aghbari et al. 2017), cildi ve mukoza zarlarında tutulumu olan kronik (Al-Hassiny et al. 2018) ve immünolojik (S. S. De Rossi and Ciarrocca 2014) olarak etki gösteren bir enflamatuvar hastalıktır (Şekil 2.3-1). LP etiyojisi, tam olarak anlaşılamamıştır (Aghbari et al. 2017) fakat otositotoksik T hücrelerinin oluşturduğu immün yanıtının bazal keratinositlere karşı olduğu düşünülmektedir (S. S. De Rossi & Ciarrocca, 2014). Kutanöz LP tanısı alan hastaların % 65'inde oral lezyonlar görülebilir ve %15 ila % 35'inde sadece oral tutulum görülebilir (Boyd and Neldner 1991). Aghbari et al., (2017) çalışmalarında, LP'nin malign dönüşüm oranları %0.07-5.8 arasında değiştiği gösterilmiştir. En çok tutulum gösteren anatomik bölgeler, bukkal mukoza, dişeti ve dildir (Bandyopadhyay et al. 2017). Genellikle bilateral olan lezyon dağılımı, diş etinde lokalize olabilir (Cheng, et al., 2016; Kurago, 2016). Hastaların yaklaşık %10'unda tipik olarak deskuamatif olan dişeti LP'si görülmektedir (Olson, Rogers, and Bruce 2016). LP'nin retiküler, papüler, plak, eritematöz veya atrofik, eroziv ve büllöz olmak üzere 6 klinik formu bulunmaktadır (Olson, Rogers, and Bruce 2016). Retiküler LP, Wickham stria ve hiperkeratotik plaklar veya papüller ile karakterize olup, en yaygın LP'dir (Bandyopadhyay et al., 2017). Eroziv LP, ülser ve ilişkili keratotik beyaz stria alanları olan atrofik bir görünüme sahiptir (Au, Patel, and Campbell 2013). Genellikle retiküler LP ile birlikte ortaya çıkan eritematöz LP, mukozal atrofi ile karakterizedir (Olson, Rogers, and Bruce 2016). Plak benzeri LP, sıklıkla dil üzerinde görülür ve oral lökoplaki görünümüne benzer beyaz lezyonlarla tanımlanır (Au, Patel, and Campbell 2013). Eroziv ve eritematöz LP'de oluşan lezyonlar önemli ağrıya neden olduğu gibi konuşma, yutma ve çiğneme eylemlerine de engel olabilir ve bu durum sigara içenlerde daha sık görülmektedir (Y. S. L. Cheng et al. 2016). LP tanısı klinik olarak konulmaktadır ve histolojik olarak doğrulanmaktadır (Halonen et al., 2018). Immünfloresan yöntemi kullanılarak, LP tanısı desteklenmektedir ve diğer lezyonlardan ayırımı sağlanmaktadır (Y. S. L. Cheng et al. 2016). LP tedavisi asıl hedeflene, iltihabı azaltmak ve semptomatolojiyi hafifletmektir, ilerlemeyi hafifletici ve/veya iyileştirici değildir (Cheng et al., 2016; Eisen, et al. 2005). Tedavi gerektirmeyen asemptomatik retiküler lezyonlarda, sürekli gözlem önerilmektedir (Eisen et al. 2005). Semptomatik LP'nin ilk tedavisi genellikle topikal steroidlerle yapılmaktayken (Eisen et al. 2005), erozyonlu LP tedavisinde intralezyonel kortikosteroidler kullanılmaktadır (Liu et al. 2013). Daha şiddetli veya refrakter olan LP vakalarında sistematik steroidler kullanılmaktadır (Olson, Rogers, and

Bruce 2016). LP hastaları uygulanan kortikosteroid tedavisine yanıt vermezse, topikal kalsinörin inhibitörleri kullanılabilir (Olson et al., 2016).

İlk olarak 1950'lerin başında tanımlanan oral submuköz fibroz (OSF), yüksek oranda Asyalı insanlarda görülen potansiyel olarak malign özelliği taşıyan bir hastalıktır. Risk faktörleri arasında tütün/alkol kullanımı ve betel çiğneme bulunmaktadır (Thomson et al., 2018). OSF patogenezinin anlaşılması için yapılan çalışmalara (epidemiyoloji, histopatoloji ve moleküler biyoloji/patoloji) rağmen, hala tam olarak anlaşılamamıştır (Batra 2014). Son çalışmalarda, OSF'nin gelişiminde olası mekanizmalar olarak artan sentez veya azaltılmış kolajen yıkımına odaklanmıştır ve kollajen düzensizliğinin bir sonucu olduğuna dair kanıtlar vardır ayrıca areca-nut, kollajen metabolizmasının farklı aşamalarında değişikliklere neden olan önemli bir rol oynamaktadır (Batra, 2014; W.M. Tilakaratne, 2013). Kronik ve ilerleyici bir hastalık olan OSF'nin klinik prezentasyonu, hastalığın tespit aşamasına bağlıdır. Hastaların çoğunda OSF, baharatlı yiyeceklere karşı duyarsızlık, dudak/dil/damak sertliği ile ağız açılmasının ve dil hareketinin değişen derecelerde sınırlanmasına neden olmaktadır (Tilakaratne, et al., 2006). Ağız boşluğunun, farenksin ve yemek borusunun üst üçte birinin çoğunu etkileyen submukozal fibroz, OSF'nin ayırt edici özelliğidir. Yüksek oranda Hindistan, Bangladeş, Sri Lanka, Pakistan, Tayvan, Güney Çin, Polinezya ve Mikronezya'da görülen OSF, Asyalı göçmenler arasında İngiltere ve Güney ve Doğu Afrika'ya çeşitli vaka serileri bildirilmiştir (S. Johnson, & Van Der Waal, 2007). Farklı ülkelerde OSF prevalansında önemli bir değişiklik olduğu bildirilmiştir (IACR Working group, 2004). OSF, geniş bir kromozomal, genetik ve moleküler değişiklik spektrumu patogenezi ile ilişkilidir (W.M. Tilakaratne, 2013). Tembul quid içinde bulunan toksik maddelerin etkileri, OSF gelişiminde genetik yatkınlıkta önemli bir rol oynamaktadır (W.M. Tilakaratne, 2013). OSF doku örneklerinde, Sitolojik değişiklikler (mikronükleuslar ve binükleasyon) (Joshi et al. 2011) ve nükleer anomaliler (karyoreksis ve karyoliz gibi) (W.M. Tilakaratne, 2013) yüksek oranda olduğu belirtilmiştir. OSF'de 716 genin aşırı ekspresyonu gözlenirken, 149 genin ekspresyonunda azalma saptanmıştır (W.M. Tilakaratne, 2013). Fibroblastik çoğalmayı uyardığı bilinen TNF- α proteinini kodlayan genlerde meydana gelen polimorfizmlerinin OSF için önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Tilakaratne et al. 2006a). Özellikle 50 yaş üstü OSF hastalarında, Arg 158 Gln genotipinde lizil oksidazın genetik polimorfizmi bildirilmiştir (Tilakaratne et al., 2006b). Asya ile sınırlı kalmayan görülme sıklığı ile halk sağlığının önemli bir sorunu olan OSF, dünya çapında areca nut ve türevlerini çiğnemeye devam edildiği sürece artacağı bildirilmiştir (Arakeri et al. 2017).

Aktinik keratoz (AK)'lar kronik güneşe maruz kalmadan kaynaklanan ve invaziv OSCC'ye ilerleyebilen epidermal keratinositik displazi lezyonlarıdır, ancak klinisyenler AK premalin lezyonların, yüzeysel OSCC in situ veya kronik güneş hasarlı cildin epifenomu olup olmadığı konusunda anlaşılamamaktadır (Siegel, et al., 2017). AK'ler, ciddi sağlık sonuçlarına yol açan malign transformasyonu olan keratinosit karsinomuna (KC), ABD'de ve ağırlıklı olarak açık tenli popülasyonlara sahip ülkelerde yüksek oranda görülen bir kanser türüdür ve derinin OSCC'ünü ve bazal hücreli karsinomu (BCC) içerir (Siegel, Korgavkar, and Weinstock 2017). Bazı klinisyenler, AK'lerin kronik ultraviyole (UV) radyasyona maruz kalmadan kaynaklanan ve invaziv SCC'ye ilerleme yeteneğine sahip epidermal keratinositik displazi lezyonları olduğu konusunda hemfikirken, bazıları AK'yi farklı premalin bir lezyon olarak tanımlamaktadır, spesifik sınıflandırma sistemleri değişiklik göstermektedir (Criscione et al. 2009). AK'leri çevreleyen sağlıklı ciltte, hücrel ve nükleer atipik morfoloji ortaya konulmuştur (Ulrich et al. 2010). Hem imikvimod (Kaur et al., 2010) hem de 5-fluorourasil (5-FU) (Kopera & Kerl, 2014) tedavisinin içindeki enflamasyonu tetikleyerek subklinik AK'leri tedavi ettiği gösterilmiştir. Histopatolojik olarak AK'ler, polarite kaybı, nükleer pleomorfizm ve bazal epidermiste tüm epidermise yayılabilir olan artmış mitotik figürler ile atipik keratinositler ile karakterizedir (Siegel, Korgavkar, and Weinstock 2017). Ter bezlerinin ve saç köklerinin keratinositleri (akrosyngia ve akrotrichia) korunmaktadır (Röwert-Huber et al. 2007). Bazı lezyonların içinde veya çevresinde telanjiyektazi varken (Moy 2000), diğerleri daha yoğun pigmentlidir ve bazıları verrüköz keratoz adı verilen proliferasyonlar ile agresif gelişir (R. Rossi, et al., 2007). AK'lerin semptomları kaşıntı ve hassasiyet içerir, ancak birçoku asemptomatiktir (Rosen et al., 2013). Birçok AK, dermiste güneş elastoza ve hafif bir inflamatuvar lenfosit infiltrasyonu ve plazma hücresi gösterir (R. Rossi, Mori, and Lotti 2007). Bu ortak özelliklere rağmen, AK'ler histolojik olarak değişmesine göre; hipertrofik, atrofik, bowenoid, akantolitik, likenoid ve proliferatif olmak üzere altı tipe ayrılmaktadır (R. Rossi, Mori, and Lotti 2007). 83 farklı randomize kontrollü çalışmanın 2012 Cochrane incelemesi, diklofenak, 5-FU, imikvimod ve ingenol mebutat ile alan tedavisinin benzer etkilere sahip olduğunu ve farklı AK tedavileri ile azalmış SCC oranları arasındaki ilişki hakkında veri bulunmadığını bulmuştur (Aditya K Gupta, et al., 2012).



Şekil 2.3-1: OPML lezyonları. (A)Eritroplaki / lökoplaki. Dilin ventral yüzeyini içeren yaygın beyaz ve fokal olarak eritematöz plak benzeri bir lezyon görülebilir. (Ok, eritroplakik alanı gösterir. Ok başı lökoplakik alanı gösterir). **(B)** Ülseratif liken planus. Beyaz retiküler fokal olarak dantelli lökoplaki alanlarıyla çevrili ülserasyonun odak alanını (ok). Lezyon üstün ve aşağı doğru çizgili bir şekilde uzanır (Maymone et al. 2019).

Oral kavitede görülen premalin lezyonların da OSCC'ye dönüşebildiği bilinmektedir (WHO, 1978). Histopatoloji ile mukozal displazi tespit edilirse, kanser gelişimi olasılığı değişken bir süre içinde artar (Iocca et al. 2019). Epitelyal displazi varlığı genellikle malignite öncesi lezyonlarda malign gelişimin en önemli belirleyicilerinden biri olarak kabul edilir (Reibel 2003). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından oral kavitede oluşan epitelyal displazileri sınıflamada kullanılan kriterlere göre displazi, hücresel atipinin bulunmadığı ve epitel mimarsının korunduğu hücre sayısındaki artışla hiperplazi şeklinde ya da hafif derece, orta derece ve ağır derece displazi veya karsinoma in situ olarak tanımlandığı gibi (Ranganathan and Kavitha 2019), displastik bir alanın varlığı, malign dönüşüm oranı literatürde değişken bir şekilde bildirilmesine rağmen, her zaman invaziv karsinomaya dönüşme riskini taşıdığı belirtilmiştir (Iocca et al. 2019). Hücresel değişikliklerin en düşük olduğu ve epitel tabakanın 1/3'lük kısmında sınırlı olan lezyon hafif displazyken, epitelinin tam kalınlığının 2/3'lük kısmında orta displazi, epitelin alt 2/3'lük kısmına aştığı kısım ağır displazi olarak adlandırılmaktadır (Speight, Khurram, and Kujan 2018). Oral epitelyal displazinin tanısında kullanılan mikroskopik bulgular hücresel değişiklikler ve yapısal değişiklikler olarak ikiye ayrılabilir (Ranganathan and Kavitha 2019). Hücresel değişiklikler; nükleusun anormal boyutta büyümesi (Anizonükleus), hücrenin anormal boyutta büyümesi ve değişik büyüklükte hücrelerin bir arada bulunması (Anizositozis), hiprekromatik çekirdek, büyümüş ve sayıca artmış nükleolus, atipik mitozlar, nükleus/sitoplazma oranının artış göstermesi, nükleus şeklinin anormal olması (Nükleer pleomorfizm), hücre şeklinin anormal olması (Hücresel pleomorfizm)'dır (Adel K. EINaggar et al., 2017). Yapısal değişiklikler ise,

düzensiz epitel tabakaların oluşması, tekli hücrelerde görülen prematür keratinizasyon (Diskeratozis), bazal hücrelerin sayıca artması ve hücrelerde polarite kaybının olması, mitozların artması veya anormal mitozların gerçekleşmesi, damla şeklinde epitel papillalar ve epitel papillalarında dallanmalar oluşması, epitelyal hücrelerde adezyon kaybıdır. OPML, EMT için prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Ağır displazi durumunda hafif displazi durumuna göre malin dönüşüm riski daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (H.M. et al. 2009; Sperandio et al. 2013; S. Warnakulasuriya et al. 2011). LP'nin malign dönüşümüyle ilişkili en yaygın klinik alt tip eroziv LP (% 1.7), ardından eritematöz veya atrofik LP (% 1.3) ve son olarak retiküler LP'dir (% 0.1). Genel olarak, LP'li hastaların %1,1'inde OSCC geliştiği gösterilmiştir (Au, Patel, and Campbell 2013). OSCC, premalin br lezyondaki displazik değişiklikler sonucu hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla bazal membranı aşması ve bağ dokusu invazyonu yaparak gelişebilir yada displazi evrelerini atlayarak doğrudan karsinom olarak başlar ve hızla ilerler (Speight, Khurram, and Kujan 2018).

2.3.1. OPML'in Moleküler Biyolojisi

Premalin lezyonlar, histolojik olarak tanımlanmış displazi yokluğunda bile OSCC ile ortak moleküler genetik özelliklere sahiptir. OSCC'nin gelişimi genel olarak, klonal bir hücre popülasyonuna diğerlerine göre bir büyüme avantajı sağlayan çoklu, klonal, genetik değişikliğin gelişmesine dayanır. OSCC'de oral mukozanın dönüşüme uğradığı mekanizma (yani bir kokarsinojen olarak alkolle birlikte tütün, betel nut şeklinde kanserojenlere kronik maruz kalma) nedeniyle, karsinogeneze ile ilişkili çok çeşitli moleküler değişiklikler vardır. Çalışmalar, OSCC teşhisi sırasında % 60'a kadar lökoplaki birlikte görülme sıklığını göstermiştir (Gupta ve diğerleri, 1980; Bouquot ve diğerleri, 1988; Reibel, 2003). Oral lökoplaki tanısı almış hastalar, lezyon displastik özellikler gösteriyorsa, % 36'ya varan bir sonraki OSCC gelişimi insidansına sahip olduğunu gösteren çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Silverman ve diğerleri, 1984; Lumerman ve diğerleri, 1995; Schepman ve diğerleri, 1998). Displazinin yokluğunda bu lezyonlar hala %15'lik bir kanser gelişimi insidansına sahiptir (Silverman ve diğerleri, 1984).

Artan heterozigotluk kaybı (LOH), üst aerodigestif kanaldaki histopatolojik ilerleme ile ilişkilendirilmiştir (Califano ve diğerleri, 1996). Literatürde bulunan çalışmalar, kromozom kolları 3p ve 9p'nin LOH'si (lökoplaki'nin %50'sini içerir (Rosin ve diğerleri, 2000; van der Riet, 1994)), oral lökoplaki'de artmış malignite potansiyeli ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Emilion ve diğerleri, 1996; Mao, 1997; Zhang ve Rosin, 2001). Tek başına

bu lokuslardaki LOH, 3,8 kat artmış malign transformasyon riski yaratırken, 4q, 8p, 11q, 13q ve 17p lokuslarındaki ek LOH, 33 kat artmış malign transformasyon riski ile ilişkilidir (Rosin ve diğerleri , 2000). Lökoplastik lezyonların %55'inde mikrosatellit uyumsuzluğu (MSI) mevcuttur (Partridge ve diğerleri , 1998). P53 (17p3) lokusunun LOH'si spesifik olarak malignite gelişimi için daha yüksek riske sahip premalin lezyonlarda restriksiyon uzunluk fragman polimorfizmi ile gösterilmiştir(Partridge ve arkadaşları , 1998).

Oral eritroplaki ve lökoplaki arasındaki histolojik benzerlikler nedeniyle, oral eritroplaki lezyonlarının LOH, anöploidi ve MSI dahil lökoplaki ile benzer subseleler değişikliklere sahip olmasını beklenmektedir. 7. ve 17. kromozomların polisomisi, oral eritroplakiye dahil edilmiştir (Hittelman ve diğerleri , 1993). Oral skuamöz hücreli karsinomda değiştiği bilinen çeşitli kromozomal lokuslarda LOH ve alelik kazanç için oral eritroplaki ve lökoplaki lezyonlarını inceleyen Partridge ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, oral eritroplaki lezyonlarının Rb geni, p53 geni veya DCC geni içinde 9p, 3p'de LOH veya alelik kazanıma sahip olabileceği sonucuna varılabileceği belirtilmiştir (Partridge ve diğerleri , 1998). OLP'den OSCC'ye rapor edilen genel malign dönüşüm riski, yılda %0,4-5,6 veya %0,04-1,74 arasında değişmektedir (van der Meij ve ark. , 2003). Kötü huylu dönüşüm, en çok atrofik veya aşındırıcı OLP vakalarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir(Silverman, 2000). OLP'nin erken moleküler genetik çalışmalarından biri, çoğu oral tümörde sıklıkla meydana gelen 3p, 9p ve 17p kromozomlarında bulunan dokuz lokusta LOH sıklığına baktıldığında, OLP lezyonları minimal genetik sapma içerirken, çeşitli displastik ve habis OSCC lezyonları, çoklu kromozomlar üzerinde giderek artan LOH frekanslarına sahip olduğu gösterilmiştir (Zhang ve diğerleri , 1997). P53 pozitif biyopsilerin sayısındaki artış, OLP'deki displazi derecesi ve farklılaşma kaybı ile önemli ölçüde ilişkisini ve çoğu OLP lezyonu, epitelin bazal tabakasıyla sınırlı karakteristik bir p53 pozitif çekirdek paternine sahip olduğunu gösteren bir çalışmada, OLP lezyonlarının 27'sinden 9'u (%33) 5 ila 8 eksonlaa mutasyonlar için tarandığında p53 mutasyonlarının bulunduğu görülmüştür (Ogmundsdottir ve diğerleri , 2002).

Epidemiyolojik çalışmalar OSF'nin, malign dönüşüm oranının %3-19 arasında değiştiğini göstermiştir (Murti ve ark . 1985 ; Yusuf ve Yong, 2002). Heterokromatik kromozom bölgelerinin polimorfizmleri, kardeş kromatid değişimleri ve anormal p53 ekspresyonu ve mutasyonları gibi bazı endişe verici bulgular OSF karsinogenezinde rol oynayabilir (Cox ve Walker, 1996b). OLP lezyonlarına benzer şekilde, her iki grup da normal mukoza ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek ekspresyon

seviyelerine ve mutasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (Chiba ve diğerleri , 1998). OSF'de APC geninin mutasyonu, ağız kanserine ilerleme riski anlamına gelebildiğini, ancak bu değişiklikleri daha fazla karakterize etmek için daha geniş bir hasta grubu üzerinde ek çalışma yapılması gerektiğini belirtilmiştir (Largey ve diğerleri 1994). APC mutasyonlu LOH, oral kanserlerde sıklıkla saptanmamış olsa da, birçok çalışma oral skuamöz hücre kanserlerinin %25'inde LOH'yi tanımlamış ve %53,8'i LOH'yi göstererek daha yüksek bir sayı önermiştir (Huang ve diğerleri , 1997a ; Williams, 2000). Bu nedenle APC, beta katenin (Sierra) ile etkileşimi yoluyla Wnt sinyal yolunun düzenlenmesindeki fonksiyonları nedeniyle OSF-OSCC'nin malign dönüşümünde rol oynayabilir (Sierra vd , 2006). Ağız kanseri ve OSF dahil çeşitli premalin lezyonları olan hastalar, bcl-2'nin anormal ekspresyonunu ve p53 ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Aksine, OSCC'nin %30'a kadarı, her iki proteinin aşırı ekspresyonunu gösterdi ve pozitif LNT durumu ile p53 ve bcl-2 ekspresyonu arasında önemli bir korelasyona sahipti (Teni ve diğerleri , 2002). Bcl - 2 protein ailesindeki değişikliklerin, epitelyal karsinogenezin erken aşamalarında ve OSCC'nin gelişiminde rol oynayabileceğini ve OSF gibi erken premalin lezyonlarda bu etkileri değerlendirmek için çalışmaların devam etmesi gerektiğini söylemişlerdir (Mithani S.K. et al., 2007).

Sonuç olarak bakıldığında, maligniteye dönüşüm riski yüksek olan premalin lezyonlar arasında, orta ve şiddetli dereceli displazi ve eritroplaki görülürken, maligniteye dönüşüm riski düşük olan premalin lezyonlar ise hiperkeratoz, liken/likenoid lezyon ve hafif dereceli displazi olduğu belirtilmiştir.

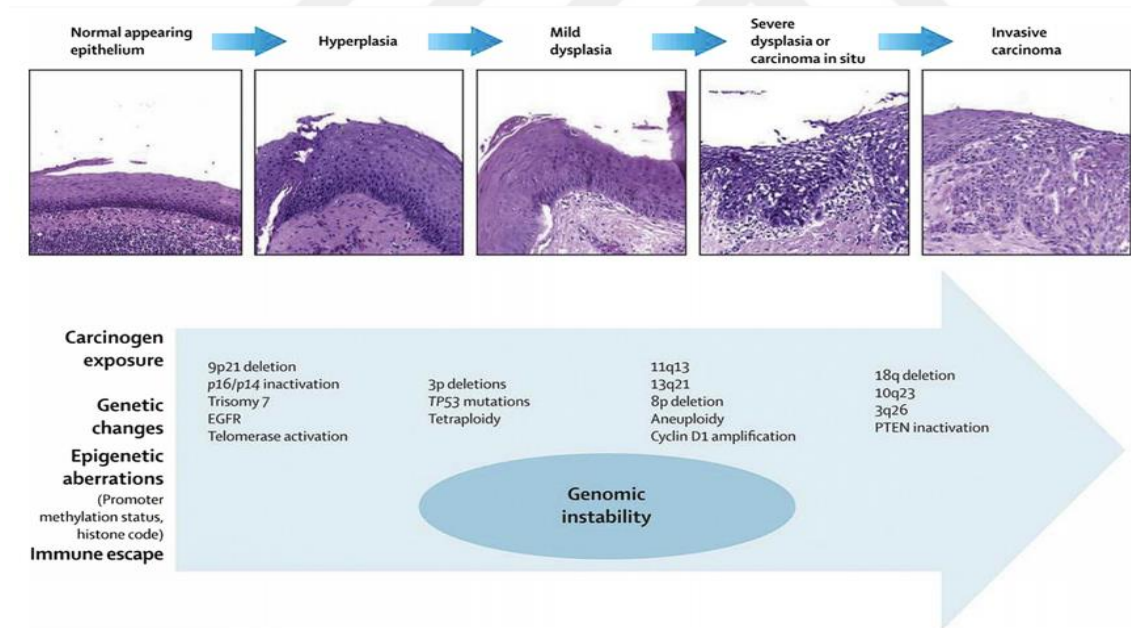
Çalışmamızda OSCC'ye dönüşüm riski yüksek ve düşük olan OPML lezyonlar (Eroziv Liken Planus:10 Liken Planus:13 Orta Displazi:3 şiddetli Displazi:3 Hafif Displazi:1) kullanılmış ve hafif, orta veya şiddetli displazinin karsinom gelişme potansiyeli, bu patolojik oluşumun çeşitli OPML ile ilişkili olabileceği göz önüne alınmıştır. OPML'in OSCC'ye dönüşümünde ayırıcı tanı olarak *GPRC5C* geninin rolü araştırılmıştır.

2.4. ORAL KAVİTE KANSERLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

2.4.1. Genetik Değişiklikler

Baş-boyun yassı epitel hücreli karsinomun farklı bir alt tipi olan oral yassı epitel hücreli karsinom (OSCC) tipik olarak insan papilloma virüsü negatiftir ve TP53 mutasyonlarını barındırmaktadır (Li, et al., 2018). OSCC'nin, tümör heterojenliğini oluşturmak için kendini yenileyebilen ve heterojen neoplastik hücrelerin klonlarını oluşturabilen kanseri başlatan hücrelerle başladığı düşünülmektedir (C. C. Li et al. 2018).

Karsinogenez, onkogenlerde ve/veya tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen epigenetik ve genetik değişikliklerin birikmesini içeren süreçtir (C. C. Li et al. 2018). OSCC'deki en önemli prognostik göstergelerden biri metastazdır. Hem epitelyal mezenkimal geçiş hem de OSCC hücreleri ile tümör mikro-çevresi arasındaki etkileşimler metastazda önemli roller oynar (C. C. Li et al. 2018). Omics teknolojilerinin, biyoinformatik ve moleküler biyolojinin entegrasyonu, karmaşık, klinik olarak anlamını ortaya çıkarır (C. C. Li et al. 2018). Çoğu OSCC tümörü, lökoplaki, eritroplaki veya proliferatif verrüköz lökoplaki gibi mevcut bir premalin lezyondan gelişir (Feller, et al., 2013). Ek olarak, OSCC, yüksek rekürrens oranı ve sık sık senkron ve/veya metakron primer tümör oluşumu ile ünlüdür (Schmitz et al. 2014). Alan kanserizasyonu, klinik veya histolojik incelemede görülmeyen, kanserojen maruz kalan mukozal epitelyumun büyük, preneoplastik alanlarının oluşumunu ifade etmektedir (Slaughter, et al., 1953). Alan kanserizasyonunun süreci moleküler düzeyde gerçekleşmektedir. Hücreler, hücre döngüsünün düzensizleşmesine ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olan genetik ve epigenetik değişikliklerin birikmesi sonucunda malign transformasyona yatkın hale gelmektedir (Feller et al. 2013)(Şekil 2.4.1-1).



Şekil 2.4.1-1: Oral karsinogenez, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi ile karakterize edilen karmaşık ve çok aşamalı bir süreçtir. OSCC'nin histopatolojik ilerlemesi, hematoxilen-eozin boyasında sunulmuştur (Argiris et al., 2008).

2.4.2. Gen-Çevre Etkileşimi ve Epigenetik Değişiklikler ile Biyobelirteç

Gen ekspresyonunun epigenetik regülasyonu, protein seviyesinde (çeviri sonrası histon modifikasyonları), DNA seviyesinde (DNA metilasyonu) ve RNA seviyesinde (kodlayıcı olmayan RNA'lar) gerçekleşir (Joosten et al. 2018). Çeşitli epigenetik modifikasyonlar, özellikle DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ve miRNA'lar ve lncRNA'lar gibi ncRNA türleri dahil epigenetik regülatörler çeşitli kanserlerin patogeneğinde rol oynamıştır (Jung, et al., 2020). Histon kuyruklarının spesifik amino asitlerinin translasyon sonrası modifikasyonları, kromatin yapısının düzenlenmesinde ve gen ekspresyonunun belirlenmesinde önemli bir işleve sahiptir (Tessarz and Kouzarides 2014).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişiklikler, DNA dizisini değiştirmenin aksine kromozomal yapıları regüle ederek gen ekspresyonunu düzenler (Egger, et al., 2004). Gen regülasyonu ve karsinogeneğinde önemli rol oynayan histon modifikasyonu, ökaryotik DNA'yı histon proteinlerinin (H2A, H2B, H3 ve H4) bir oktamerinin etrafına sarılmış daha yüksek dereceli bir kromatin fiber içine paketleyen yüksek derecede düzenli kromatin yapısını etkilemektedir (Jung et al., 2020; Rajnee Kanwal et al., 2014). Histon modifikasyonlarında rol oynayan enzimler; histon asetiltransferaz (HAT'ler), histon deasetilaz (HDAC'lar ve sirtuinler), histon metiltransferaz (HMT'ler), histon demetilazlar (HDM'ler), fosfatınlar, kinazlar, ubikuitin ligazlardır (Dillon, 2006; Fischle, et al., 2003). Genom çapında yapılan çalışmalarda, spesifik genomik bölgelerdeki çeşitli modifikasyonların kombinasyonları, kromatin yapısının ökromatinleşmesi veya heterokromatinleşmesiyle gen ekspresyonunun aktivasyonuna veya bastırılmasına yol açabileceği gösterilmiştir (Rodríguez-Paredes and Esteller 2011). H4K20 ve H2BK5'in lizin monometilasyonu; H3K4me3, H3K36me3 ve H3K79me3'ün trimetilasyonu; H3K9 ve H3K14'ün asetilasyonu gen ekspresyonun aktivasyonu ile sonuçlanırken, H3K9'un di- veya trimetilasyonu ve H3K27'nin trimetilasyonu gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açar (Rajnee Kanwal, et al., 2014). DNA üzerinde meydana gele histon modifikasyonları tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyon aktivitesinin azalmasına ya da protoonkogenlerin transkripsiyon aktivitesinde artışa neden olarak malign transformasyona katkıda bulunabilir (Easwaran, et al., 2014; Kurdistani, 2011).. OSCC'de hücre proliferasyonunda ve epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT), H3K9ac'ın hipoasetilasyonunun ilişkili olduğunu göstermiştir (Webber et al. 2017). Özellikle protoonkogenlerde meydana gelen histonların hiperasetilasyonu, gen ekspresyonunu aktive eder ve genin onkogene dönüşmesine neden olurken, tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde meydana gelen histonların hipoasetilasyonu, ilgili

geni baskılayarak kanserin gelişmesini ve ilerlemesine neden olmaktadır (Audia and Campbell 2016).

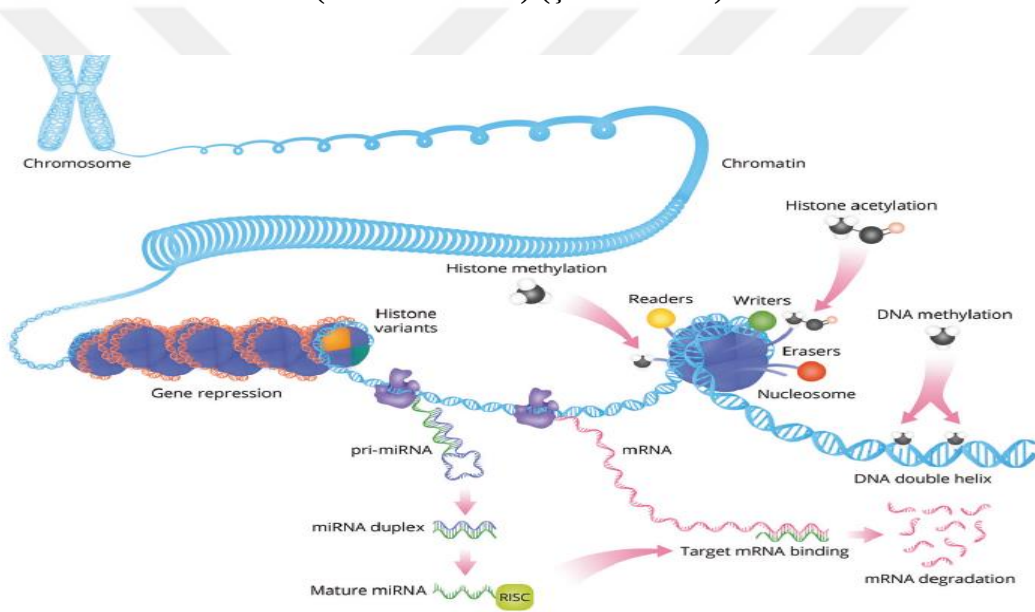
Nükleozom üzerindeki sayısız kovalent modifikasyon, genellikle dinamik ATP'ye bağlı kromatin yeniden şekillenmesi için iskele ve bağlam sağlar. Biyokimyasal aktiviteleri ve alt birim kompozisyonlarına dayanarak, memeli kromatin yeniden modelleme; pozisyon hasarı/sükroz fermentasyon (SWI/SNF) ailesi, yapay SWI (ISWI) ailesi, nükleozom yeniden modellenmesi ve deasetilasyon (NuRD)/Mi-2/kromodomain helisaz DNA bağlama (CHD) ailesi, 80 (INO80) gerektiren inositol ailesi olmak üzere dört ana aileye ayrılabilir (Dawson and Kouzarides 2012). Evrimsel olarak korunmayan bu enzimler, ATP'yi histonları harekete geçirmek ve değiştirmek için bir enerji kaynağı olarak kullanır (Dawson and Kouzarides 2012). Kanser genomlarının diziliminin ortaya çıkmasıyla; SNF5, BRG1 (Wilson & Roberts, 2011) ve MTA1 (Li et al., 2012) gibi çeşitli kromatin yeniden modelleme familyalarından birkaç üyenin, malin hücrelerde mutasyona uğradığı bilinmektedir. SWI/SNF üyelerinde meydana gelen mutasyonların, kendini yenileme ve farklılaşma arasındaki dengeyi kaldırarak maliniteyi arttırdığı söylenmiştir (Dawson and Kouzarides 2012). Son veriler, SWI / SNF kompleksleri için hücre döngüsü ilerlemesini, hücre motilitesini ve nükleer hormon sinyalizasyonunu düzenlemede rol oynayabileceğini önermektedir (Wilson & Roberts, 2011).

İnsan genomundaki yaklaşık 1000 adet miRNA geninin, birden fazla protein kodlayan transkripti hedeflediği söylenmiştir (Chuang and Jones 2007). Küçük kodlamayan RNA'lar (ncRNA) grubuna ait olan miRNA'lar kısadır (18-25 nükleotit uzunluğunda) ve tekli RNA türleridir (Jung et al. 2020). miRNA'ların protein kodlayan genlerin %60'ından fazlasının, translasyon oranını ve hücresel süreçlerin düzenlenmesine katkı sağladığı varsayılmıştır (Fabian et al., 2010). miRNA'lar, translasyonu inhibe eden hedef mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesinde tamamlayıcı sekanslarla eşleşen kısa, kodlayıcı olmayan RNA'lardır (Manel Esteller 2008). Kodlayıcı olmayan RNA, dizilere bağlanma, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozu gibi önemli pro-tümörjenik süreçleri düzenleyemektedir (Jung et al. 2020). İnsan kanserlerinde güçlü prognostik göstergelere sahip olan miRNA'lar sayesinde OSCC'lerin moleküler karakterizasyonu (Jithesh et al. 2013; Lu et al. 2005), normal ve malin mukozal epitelyumu ayırt etmek için %93 doğruluk elde edilir (Lajer et al. 2011). miRNA'ların ekspresyonu promoter metilasyonu ile düzenlenebilir (Joosten et al. 2018). Çoklu miRNA'ların, tek bir hedef mRNA'nın ekspresyonunu düzenlediği ve miRNA'ya bağımlı gen regülasyonunda bir fonksiyonel fazlalık derecesini gösteren gösterilmiştir (Kita et al. 2017). miRNA'lar genellikle genom içindeki kırılma bölgelerinde bulunduğundan,

ekspresyonları, nokta mutasyonları, delesyonlar, amplifikasyonlar ve translokasyonlar dahil olmak üzere DNA hipermetilasyonu hem de hipometilasyon çeşitli genetik değişiklikler yoluyla düzensiz hale getirilebilir (Croce 2009; Lujambio et al. 2008). miRNA'lar tümör dokularında fazla miktarda eksprese olabilir veya az miktarda eksprese olabilirler (Jung et al. 2020). onkogenik miRNA'lar (onkomiR'lar), tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu inhibe ederken, tümör baskılayıcı miRNA'lar (tsmiRNA'lar) onkogen ekspresyonunu inhibe etmektedir (Svoronos et al., 2016). Transkripsiyonel düzensizlik, epigenetik modifikasyonlar, kromozomal değişiklikler ve tek nükleotid polimorfizmleri miRNA ekspresyonunu değiştiren mekanizmalar arasında yer almaktadır (Bartel, 2004; Gorenchtein, et al., 2012).

DNA Metilasyonu: DNA seviyesinde, bir metil grup'unun (CH_3) DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) ile ilgili genin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki guaninden önce gelen sitozinlere kovalent bağ ile eklenmesine DNA metilasyonu denilmektedir (Herman and Baylin 2003; Joosten et al. 2018). DNMT'ler, HDAC'leri ve metil-CpG-bağlayıcı proteinlerini (MBD'ler) bölgeye gelmesini sağlar, bunun sonucunda HDAC ile asetil grupların histonlardan uzaklaştırılmasıyla daha kompakt bir nükleozom konformasyonu elde edilmektedir (Joosten et al. 2018). Gerçekleşen bu biyolojik olay ile, DNA transkripsiyon için erişilemez hale getirilir ve ilgili genin susturulmasına neden olur (Herman and Baylin 2003). Promoter bölgesinin CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon, transkripsiyon faktörlerinin anahtar tümör baskılayıcı genlerin promotörüne bağlanmasına engel olarak bu genlerin susturulmasına ve tümör büyümesinin teşvik edilmesine yol açmaktadır (Gasche and Goel 2012; Jithesh et al. 2013). Bu modifikasyonlar DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) tarafından katalize edilir. DNA replikasyonunun ardından mevcut olan metilasyon modellerini koruyan enzim DNMT1'dir. DNMT3a ve DNMT3b, enzimleri ise metilasyonu başlatmak için metillenmemiş CpG adacıklarını hedefleyen de novo enzimleridir. Embriyogenez sırasında yüksek oranda DNMT3a ve DNMT3b eksprese edilir ve yetişkin dokularında ise minimal düzeyde eksprese edilir. Başka bir aile üyesi olan DNMT-3L, içsel metiltransferaz aktivitesinden yoksundur ve retrotranspozonların metilasyonunu kolaylaştırmak için DNMT3a ve DNMT3b ile etkileşime girer (Kinney and Pradhan 2011). DNA hipometilasyonu, DNA metilasyonu kaybı, genomik instabilite ve kanser ilerlemesi ile ilişkilidir (Rajnee Kanwal et al., 2014). LOH veya anormal DNA hipometilasyonu nedeniyle genlerin ebeveyn allel spesifik monoallel ekspresyonunun kaybıyla kanser riskinin artmasına neden olur (Hatziapostolou and Iliopoulos 2011). Tümör hücrelerinde meydana gelen global hipometilasyon, normal hücrelerde metillenmemiş lokal

promotör ilişkili CpG adalarının hipermetillenmesi eşlik eder. Tümör baskılayıcı gen olan p16 geninin transkripsiyonel susturulması, OSCC tümörlerinin %50-75'inde tespit edilmiştir (Kato et al., 2006). Kanser hücrelerinde tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgelerinin CpG adacıklarında meydana gelen DNA hipermetilasyonunu tersine çevirmek için epigenetik ilaç geliştirilmiştir (C. C. Li et al. 2018). Bu ilaçların arasında yer alan ve ilk epigenetik ilaç olan DNA metilasyon inhibitörleri, kanser terapötikleri olarak kullanılması önerilir (Yoo and Jones 2006). Değiştirilmiş düzenleyici sinyal yolları ve transkripsiyonu baskılanmış p53, hücre döngüsü düzensizliğine ve apoptozdan kaçışa neden olur ayrıca OSCC'nin başlatılmasına ve ilerlemesinde de katkıda bulunur (C. C. Li et al. 2018). OSCC hücreleri ve çevresindeki mikroçevre arasındaki sürekli olan etkileşimler metastazı, lokal immünsüpresyon ve tümör invazyonunu desteklemektedir (Yan et al. 2017) (Şekil 2.4.2-1).



Şekil 2.4.2-1: Gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesine genel bakış. (Joosten et al. 2018)

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, miRNA'lar ve lncRNA gibi epigenetik modifikasyonlar, tanı ve prognoz için klinikte biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Jung et al. 2020). Diğer biyobelirteçlere nazaran özellikle kararlılıkları, nispeten düşük maliyetlerle oluşturulabilmeli ve DNA metilasyonunun biyobelirtece özgü bölgelerine kısıtlamalarıyla daha çok avantajlı olan DNA metilasyon biyobelirteçleridir (Lin et al., 2009; Wei et al., 2006). Epigenetik biyobelirteçler dokuda ve vücut sıvılarında tespit edilebilmektedir (Rajnee Kanwal et al., 2014). Vücut sıvılarında ve plazma DNA'larında tespit edilebilen CDH13, MYOD1, MGMT, p16 INK4b ve RASSF1A genlerinin hipermetilasyonu kanser türleri arasında değişmektedir (Delpu et al., 2013; Laird, 2005). Mesane kanserinde idrar sediman

örneklerinde hipermetillenmiş kanser genleri tespit edilebilmektedir (Rajnee Kanwal et al., 2014). Prostat kanserinde iyi huylu tümörleri ve kanserde meydana gelen değişiklikler arasındaki farklılıkları anlamada *RASSF1A*, *RARB2*, *APC* ve *GSTP1* genlerin kombinasyonları hipermetilasyon analizleri kullanılmıştır (Madu and Lu 2010; Rivenbark and Coleman 2007; Shivapurkar and Gazdar 2010). Histon modifikasyon paternleri kanserde prognostik bilgi ile beraber tanısıl bilgi de sağlamaktadır (Rajnee Kanwal et al., 2014). Artmış H3K4 dimetilasyonu ve H3K18 asetilasyon aktivasyonu, kanserde kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Patra et al., 2011). Metastatik prostat kanserlerinde H3K27 metilaz EZH2'ye ek olarak, demetilaz JMJD3'ün aşırı ekspresyonu bildirilmiştir (Peter 2009). miRNA'larda kanserin tanısında ve prognozunda potansiyel bir epigenetik biyobelirteçler olarak önerilmektedir (Rajnee Kanwal et al., 2014). MiR-199a, miR-146, miR-200a, miR-221, miR-214 ve miR-222 gibi bazı miRNA'ların aşırı ekspresyonu olduğu, miR-100'ün insan kanserlerinde ekspresyonunun daha az olduğu bulunmuştur (Ardekani and Naeini 2010). Son çalışmalarda, let-71 tümör baskılayıcı olarak belirlendiği bildirilmektedir (Q. Cheng et al., 2013). miR-429, miR-200a/b ise, EMT ile düzenlenen birincil transkript üzerinde kümelenmiş şekilde olduğu bulunmuştur (Q. Cheng et al., 2013). Biyobelirteçlerdeki en büyük sınırlama, meydana gelen değişikliklerin kanser hücrelerindeki gen aktivitesindeki değişikliklerle tam olarak ne ölçüde ilişkili olduğunun net olarak bilinmemektedir (Rajnee Kanwal et al., 2014).

2.5. G Protein-Eşleşmiş Reseptör Sınıf C Grup 5 Üye C (*GPRC5C*)

GPCR ailesi 3 reseptörleri (aynı zamanda C ailesi olarak da bilinir) yapısal olarak diğer GPCR'lere benzerdir, ancak herhangi bir önemli dizi benzerliği göstermez ve bu nedenle ayrı bir grubu temsil eder (H., P., and A.A. 2007). Bu reseptörler yapısal olarak dört unsurdan (bir N-terminal sinyal dizisi; büyük bir hidrofilik hücre dışı agonist bağlama bölgesi (disülfür bağlarında rol oynayabilen korunmuş sistein kalıntısını içeren bölge); yedi transmembran alanı içeren daha kısa bir bölge; ve değişken uzunlukta bir C-terminal sitoplazmik alan) oluşurlar (H., P., and A.A. 2007). Yedi transmembran bölgesini içeren aile 3 GPCR reseptör proteinlerinin C-terminal bölgesini temsil eder. Yedi transmembran bölgesi, içine siklamat ve laktizol gibi moleküllerin bağlandığı ve sonuç olarak tatlılık tadı verdiği bir kenetlenme cebi oluşturacak şekilde bir araya gelir (Jiang et al. 2005).

GPCR'ler sekans benzerliklerine göre, üç sınıfa ayrılır: A ailesi rhodopsin benzeri reseptörlerdir. B ailesi sekretin benzeri reseptörlerdir. C ailesi ise metabotropik glutamat reseptör benzeri reseptörlerdir (Sano et al. 2011). Önemli fizyolojik süreçleri düzenleyen bu

reseptörler, ilaç geliştirme alanında umut verici hedef olabileceği belirtilmiştir. GPCR'ler, çeşitli otokrin, parakrin ve endokrin süreçleri dahil olmak üzere geniş bir işlev yelpazesini kapsayan geniş bir protein ailesini oluşturur. Sekans düzeyinde, farklı gruplara ayrılacakları temelde önemli çeşitlilik gösterirler (Vassilatis et al. 2003). Bilinen aile üyeleri arasında, rodopsin benzeri GPCR'ler (GPCRA)(Attwood and Findlay 1994), sekretin benzeri GPCR'ler (GPCRB)(Kolakowski 1994), metabotropik glutamat reseptör ailesi (GPCRC)(Foord et al. 2005), fungal çiftleşme feromon reseptörleri (GPCRD)(Harmar et al. 2009), cAMP reseptörleri (GPCRE)(Bjarnadóttir et al. 2006) ve kıvrımlı / düzleştirilmiş (GPCRF). Çoğu GPCR, bağlandıkları ligand yerine DNA dizilerine göre tanımlanır, bilinen doğal ligandlarla eşleşmeyenler, sınıflandırılmamış GPCR'ler olarak adlandırılır (Civelli et al. 2013). GPRC5 reseptörleri diğer GPCRC reseptörlerinin aksine, kısa bir N-terminal alanına sahiptir. Bu reseptörler embriyonik gelişimde, farklılaşmada ve tümör oluşumunda önemli rol oynamaktadır. GPRC5C, 4 üyeli GPRC5 ailesine (GPRC5A, GPRC5B, GPRC5C VE GPRC5D) ait olan spesifik ligandı bulunmayan bir reseptördür. GPRC5 reseptörleri, kalsiyum algılama reseptörünü, tat reseptörlerini, va-sopressin reseptör 2'yi, metabotropik glutamat reseptörlerini ve GABA reseptörlerini içeren daha büyük C ailesi metabotropik GPCR'ler sınıfına aittir (Bjarnadóttir et al., 2005; Rajkumar et al., 2018). GPRC5 reseptörlerinin altı tipleri membran lokalizasyonu çalışmalarında, GPRC5A'nın akciğerde eksprese olduğu (Y. Cheng & Lotan, 1998; Robbins et al., 2000; Xu et al., 2005), GPRC5B'nin beyin ve plasentada eksprese olduğu (Imanishi et al., 2007; M. J. Robbins et al., 2000; M. J. Robbins et al., 2002; Xu et al., 2005), GPRC5C'nin beyin, karaciğer ve böbrekte ifade edildiği (M. J. Robbins et al., 2000; Xu et al., 2005) ve GPRC5D'nin özellikle ciltte ifade edildiği gösterildi (Bräuner-Osborne et al., 2001; Inoue et al., 2004; Xu et al., 2005).

Araştırmamızda; *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki metilasyon durumu ile metilasyona bağımlı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikleri incelemek, sağlıklı popülasyon ile karşılaştırarak daha geniş hasta grubunda ileri validasyonunun yapılması, OSCC/OPML grubunda, tümör ve eşlenik normal doku ile vücut sıvı (serum-tükürük) örneklerinde *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki metilasyona bağlı ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki araştırılarak literatüre katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca 2019/1166 no'lu dosya onayı alınan tez çalışmamızda, İstanbul Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı'na OSCC tanısı ile başvuran ve İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'na OPML tanısı ile başvuran ve zaten hekimler tarafında opere edilemesine karar verilen 30'ar adet hastaya ait tümör, eşlenik normal doku, serum ve tükürük örnekleri toplandı. Kendisinde ve ailesinde benin ya da malin hikaye bulunmayan ve kanser dışı sebeplerle hekimler tarafından ameliyat edilmesine karar verilen 15 adet sağlıklı bireye ait normal mukoza, serum ve tükürük örnekleri toplandı. Çalışmaya katılacak gönüllüler çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı.

Doku, serum ve tükürük örnekleri laboratuvarımızda -80°C'de dondurularak saklandı. Periferik kan örneklerinden santrifüj yoluyla elde edilen serum örnekleri ise vakit kaybedilmeden -80°C de saklandı.

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Cihazlar

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli olan cihazlar Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.1.1-1: Deneylerde kullanılan cihazlar

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

3.1.2. Deneylerin Gerçekleştirilmesi Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli olan kimyasal maddeler Tablo 3.1.2-1’de verilmiştir.

Tablo 3.1.2-1: Kimyasal Maddeler.

▪ Agaroz (Wisent MultiCell, Kanada) ▪ 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)	▪ Borik asit (Wisent MultiCell, Kanada) ▪ Orange G (Merck, Almanya) ▪ Deoksiribonükleotid trifosfat (Fermentas, Litvanya) ▪ Ethanol (Riedel De Haen, Almanya) ▪ SssI metilaz enzimi (New England Biolabs (NEB), ABD) ▪ Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ▪ Tris (Applichem, Almanya).
--	--

3.1.3. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Kullanılan Kimyasal Karışımlar

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli olan kimyasal karışımlar ve içerikleri Tablo 3.1.3-1’de verilmiştir.

Tablo 3.1.3-1: Kimyasal Karışımlar.

Kimyasallar	İçeriği
Parçalama Tamponu	▪ 155 mM NH₄Cl ▪ 10 mM KHCO₃ ▪ 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/İsoopropanol (1:1)	▪ 1 (Fenol / Kloroform) / 1 İsoopropanol
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 ABD'den OSCC kanseri tanısı almış (uzak organ metastazı bulunmayan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir) ve Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi ABD'den, OPML tanısı almış 30'ar hastanın cerrahi müdahalesi sırasında alınan 0,5 cm çapında tumor/eşlenik normal doku örneği ayrıca kan ve tükürük örnekleri toplandı. Kendisinde ve aile öyküsünde malin hikayesi bulunmayan fakat farklı bir hastalığından kaynaklı cerrahi operasyon uygulanmasına karar verilen 15 bireyden uvulopalatofaringoplasti (UPPP) tekniği ile 0,5 cm çapında mukoza örneği alındı. Toplanan materyaller ameliyatın ardından buz içerisinde laboratuvara teslim edilerek DNA ve RNA izolasyonu işlemlerine kadar -80°C'de muhafaza edildi.

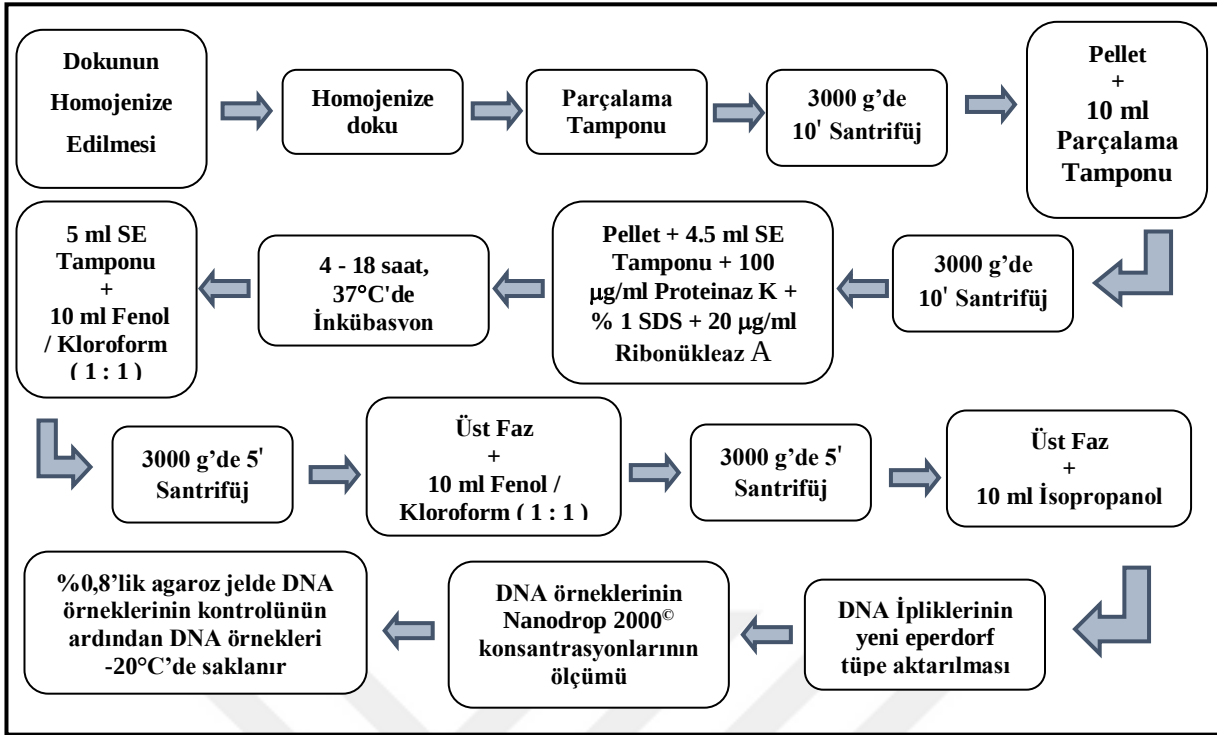
3.2.1.2. Serum Eldesi

Ameliyat öncesi, hasta ve sağlıklı bireylerden kan tüpü içerisinde 8-10 ml hacminde periferik kan örnekleri toplandı ve bu tüpler laboratuvarımızda bulunan santrifüjde 1950 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra üstte kalan serum kısım (sarı faz) kriyotüplere dağıtıldı.

3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri

Dokudan DNA İzolasyonu

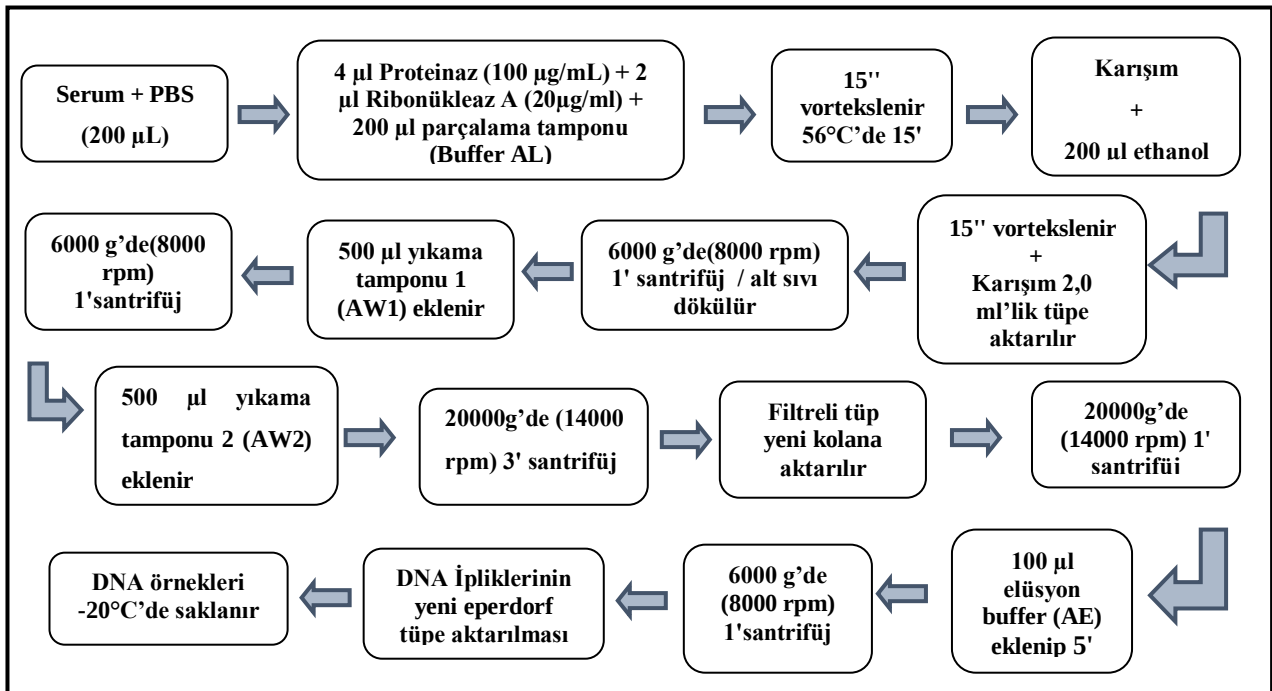
Toplanan sağlıklı ve hasta bireylere ait doku örneklerinde yapılan DNA izolasyonu Şekil 3.2.2.1-1'de gösterilmiştir. İşlem sonrası elde edilen DNA örnekleri metilasyon ve bisülfid dönüşüm deneylerine kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.2.2-1: Dokudan DNA izolasyon işlemi

Serum Örneklerinden DNA İzolasyon İşlemi

Hasta ve sağlıklılara ait serum örneklerinin DNA izolasyonu, QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Almanya) ile firmanın belirlediği Şekil 3.2.2-2'de gösterilen protokole göre gerçekleştirildi.

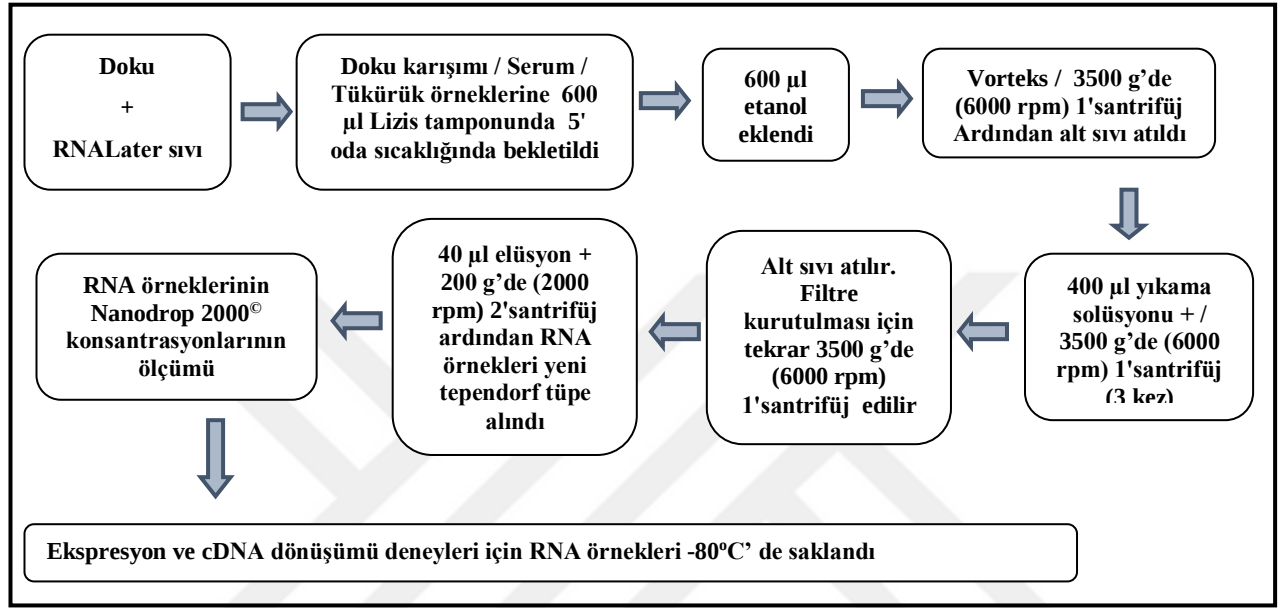


Şekil 3.2.2-2: Serumdan DNA izolasyon işlemi.

3.2.3. RNA İzolasyonu İşlemleri

Total RNA İzolasyonu

Hasta ve sağlıklı doku, serum ve tükürük örneklerinin RNA izolasyonu “Norgen Total RNA Purification Kit” (Norgen, Ontario, Kanada) protokolüne uygun biçimde Şekil 3.2.3-1’de gösterildiği gibi gerçekleştirildi.



Şekil: 3.2.3-1: Total RNA izolasyonu

3.2.4. cDNA Dönüşümü

SensiFAST cDNA Sentez Kit (BIOLINE, UK) protokolüne göre elde edilen örnekler ekspresyon deneyleri için cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA'ya dönüştürülen örnekler ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere -20°C 'de saklandı. Dönüşüm için kullanılan reaksiyon karışımı ve reaksiyon koşulu Tablo 3.2.4-1’de verilmiştir.

Tablo 3.2.4-1: cDNA dönüşümünde kullanılan reaksiyon karışımı ve koşulları

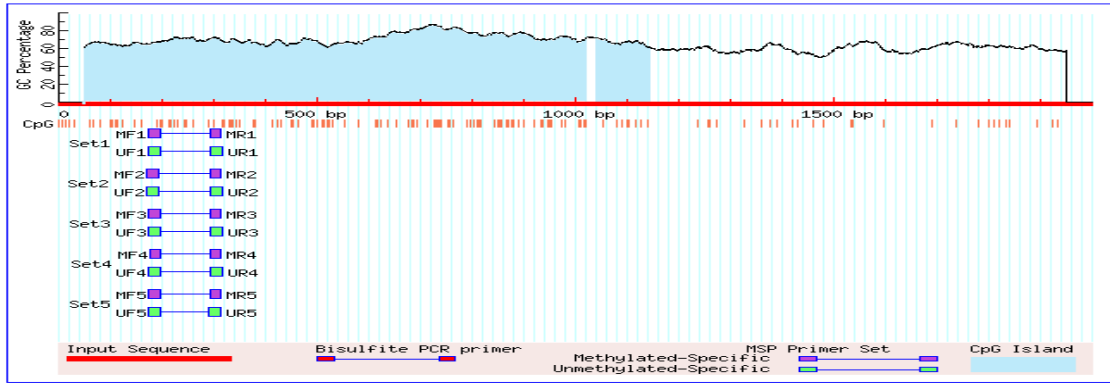
Solüsyonlar		Miktar
Toplam RNA (1 µg'ye kadar)		n µl
5x TransAmp Buffer		4 µl
Reverse Transkriptaz		1 µl
dH ₂ O		Total hacim 20 µl'ye tamamlanacağı kadar
PCR Aşaması	T (°C)	Zaman
Primer Bağlanma	25 °C	10 dk
Revers Transkripsiyon	42 °C	15 dk
	48 °C	15 dk
İnaktivasyon	85 °C	5 dk
Soğuma	4 °C	-

3.2.5. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı

Metilasyon ve ekspresyon deneylerinde kullanılacak *GPRC5C* geninin primer (MF–MR–EF–ER) ve prob dizileri, internette kullanıma açık olan Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>), genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>) ve Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) siteleri yardımıyla tarafımızca gerçekleştirildi (Tablo 3.2.5-1). Çalışmada referans gen olarak kullanılan *ACTB* geninin ekspresyon deneylerinin primerleri Demokan S ve ark. tarafından daha önce yapılmış olan çalışmadan alınmıştır (Demokan et al. 2013)(Tablo 3.2.5-2). Metilasyon deneylerinde kullanılacak *ACTB* geninin primer ve prob dizileri Carvalho AL. ve arkadaşlarının çalışmasından alınmıştır (Carvalho et al. 2008)(Tablo 3.2.5-2).

Tablo 3.2.5-1. Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *GPRC5C* geninin primer ve prob dizileri (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers).

<i>GPRC5C</i> EF	5' AGGACACCAAGAAACGGAGC '3
<i>GPRC5C</i> ER	5' GCCAGGAAGTTGAGGGCAAAG '3
<i>GPRC5C</i> MF	5' TCGTTCGGTCGTTGAAAGTT '3
<i>GPRC5C</i> MR	5' AAAAAACGCCACCCACGAA '3
<i>GPRC5C</i> Probe	5' ATTTAGCGGTCGCGTAGTTAGTTAA '3



Tablo 3.2.5-2. *ACTB* geninin primer ve prob dizileri. (MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers (Carvalho et al. 2008) EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers (Demokan et al. 2013))

<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> PROB	5' ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA '3

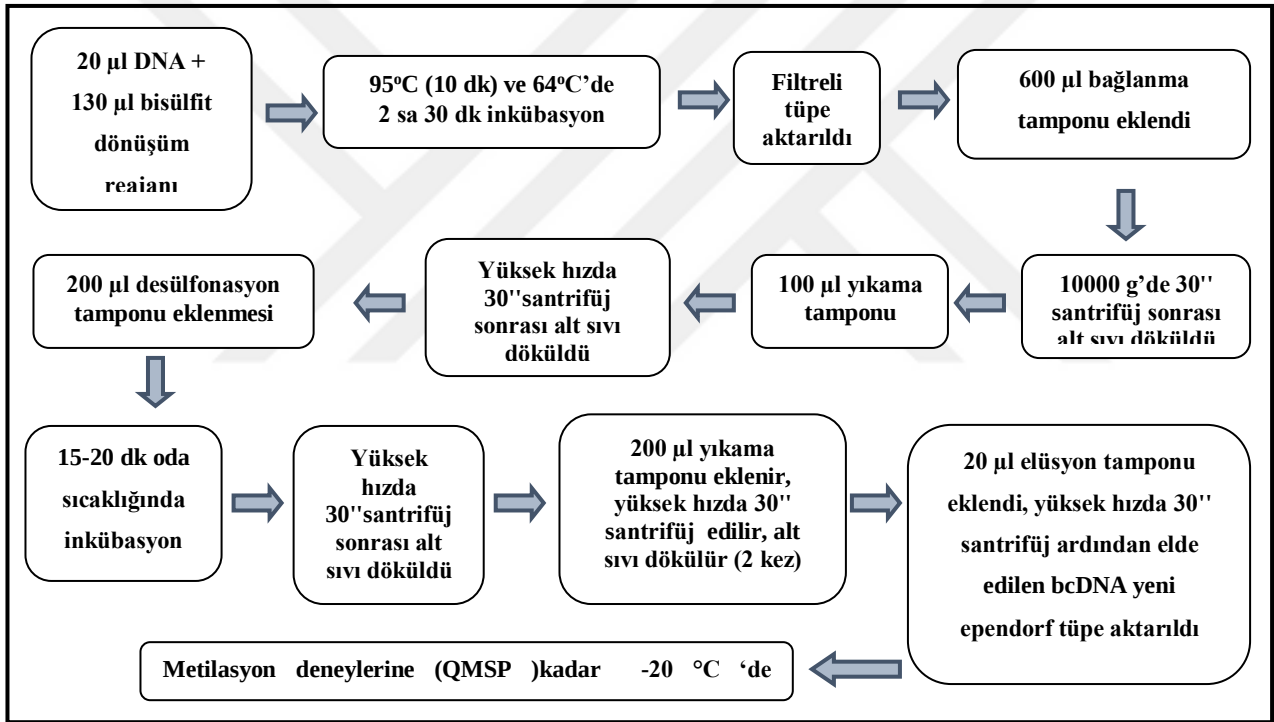
3.2.6. Metilasyon Analizi

GPRC5C genindeki promoter bölgesindeki CpG adacıklarında meydana gelen metilasyon durumu Kantitatif Metilasyon Spesifik-PCR (Quantitative Methylation Specific PCR, QMSP) yöntemi ile LightCycler 480 cihazında incelendi. DNA örnekleri bisülfite

dönüşüm kit protokolüne göre sodyum bisülfid ile muamele edilip Bisülfid Dönüştürülmüş-DNA (Bisulfite Concerted DNA, BC-DNA) elde edildi. Metile bölgelere özgü primerler ve hibridizasyon problemleri kullanıldı. Deneyin kontrolü için DNA içermeyen örnekleri negatif kontrol, sağlıklı bireylerden elde edilen lenfosit DNA örnekleri ise pozitif kontrol olarak, kullanıldı. Lenfosit DNA örnekleri SSSI metiltransferaz ardından bisülfid modifikasyonu işlemine tabi tutularak kullanıldı.

3.2.6.1. Bisülfid Dönüşüm

OSCC, OPML ve sağlıklı kişilerden elde edilen DNA örneklerinin “Zymo Methylation Gold Kit” (Zymo research, CA, ABD) kiti tarafından Şekil 3.2.6.1-1’deki protokole göre bisülfid dönüşümü gerçekleştirildi.



Şekil 3.2.6.1-1. Bisülfid DNA dönüşüm protokolü

3.2.6.2. GPRC5C geninin relatif metilasyon seviyesinin QMSP ile belirlenmesi

GPRC5C geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon seviyelerini belirlemek için, kantitatif metilasyon spesifik PCR (QMSP) yöntemi kullanıldı. Çalışmada kullanılan TaqMan hidroliz probunun, 5’ ucunda 6-florosein amid (FAM) ile işaretlenirken 3’ ucunda FAM inhbe edici (quencher) olan karboksitetrametlrodamin (TAMRA) ile işaretlenmiştir.

Sağlıklı insan lenfosit DNA' sı SssI metilaz enzimi ile muamele edilerek (sonucunda %100 metillenmiş standart olarak (LN-DNA)) metilasyon deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Elde edilen için standartlar; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 dilüe edilerek kantitatif sonuç elde edildi. QMSP deneylerinde PCR reaksiyonun koşulu ve reaksiyonda kullanılan karışımlar Tablo 3.2.6.1-1'de verilmiştir.

Tablo 3.2.6.2-1: QMSP reaksiyon karışımı ve koşulları.

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

ACTB ve *GPRC5C* genleri için eşik değeri (threshold) belirlendi. Yüzde yüz metile olan standart ve standart dilüsyonlarının konsantrasyonları Ct değerlerine (floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü) göre, program ile standart eğri grafiği oluşturuldu. Relatif metilasyon yüzdesi aşağıda belirtilen formül ile hesaplanarak her örnek için ayrı bir kantitatif sonuç elde edildi.

$$\text{Relatif Metilasyon Yüzdesi} = \frac{\text{Hedef}_{\text{konsantrasyon}}}{(\text{Hedef}_{\text{konsantrasyon}} + \text{Referans}_{\text{konsantrasyon}})} * 100$$

3.2.7. Gen Ekspresyon Analizi

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (QRT-PCR) yöntemi ile *GPRC5C* geninin hasta örneklerine ait cDNA örneklerinde ekspresyon seviyeleri belirlendi. OSCC ve OPML tanısı alan hastalara ait tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylere ait mukoza, serum ve tükürük örnekleri karşılaştırıldı.

3.2.7.1. QRT-PCR Yöntemi İle *GPRC5C* geninin Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

SYBR Green temelli Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QRT-PCR) yöntemiyle *GPRC5C* geninin ekspresyonu değerlendirildi. Tablo 14’de PCR reaksiyon karışımı ve koşulları gösterilmektedir. Hazırlanan karışım 96’lık platelere, pipet yardımıyla her kuyuda 20 µl hacimde olacak şekilde dağıtıldı. Ardından plate’in üzeri jelatin film ile kaplandı ve LC480 Real Time PCR cihazına yerleştirildi. Tasarladığımız primerler optimize edilerek reaksiyon başlatıldı.

Tablo 3.2.7.1-1: Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı ve koşulları

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

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

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{hedef}}} - C_{t_{\text{referans}}})_{\text{örnek}} - (C_{t_{\text{hedef}}} - C_{t_{\text{referans}}})_{\text{kontrol}}$$

3.2.8. Veri Analizi

IBM SPSS Statistics 20 ve GraphPad 8.0 (ücretsiz deneme süresi) programları kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Ki-kare testleri (Yates ve Fisher) hastaların klinik bilgileri ile metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmaları için kullanıldı. Ki-kare testinin sonucunda p değerinin 0,05'den eşit veya küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Wilcoxon Rank Testi ise hasta ve sağlıklı grupları arasındaki metilasyon ve ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Çoklu gruplara sahip hasta klinik parametreleri ile metilasyon ve ekspresyon seviyesindeki değişiklikler ANOVA testine göre analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik ve Klinik Özellikler

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

Malin hasta grubunun yaş ortalaması 58,6 iken erkek oranı 22/30 (%73,3) kadın oranından 8/30 (%26,7) fazladır. Hastaların %66,67'si (20/30) sigara kullanmakta ve %26,67'si (8/30) alkol kullanmaktadır. Malin hastalarında tümör anatomik olarak %33,33 (10/30) dil, %20 (6/30) bukkal mukoza, %10 (3/30) inferior alveolar arkus, %16,67 (5/30) ağız tabanı, %13,33 (4/10) retromolar trigon, %6,67 (2/30) sert damak tutulumu göstermiştir. Malin grubunda bulunan hastaların TNM sınıflamasına göre %56,67'si (17/30) evre IV, %16,67'si (5/30) evre II, %20,00'si (6/30) evre III 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) ile erkek oranı (%50) eşittir. Hastaların %56,67'ü (17/30) sigara kullanmakta ve %20'si (6/30) alkol kullanmaktadır. Premalin grubundaki hastalar patolojik tanılarına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre hastaların %33,33'ü (10/30) OL, %23,3'ü (7/30) OLD, %43,33'ü (13/30) LP displazi tanısı almıştır. Histopatolojik olarak displazi tanısı alan 6 hastanın klinik görüntüsü lökoplaki şeklindedir.

Çalışmaya katılan sağlıklı bireylerin yaş ortalaması 46,1'dir. Bu grupta erkek oranı 8/15 (%53,33) kadın oranından 7/15 (%46,67) fazladır ve 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 malin ve premalin gruba göre daha düşüktür. Sigara kullanma oranı sağlıklı grupta, malin ve premalin gruba göre daha düşük olduğu görülmüştür.

30 malin hasta grubunun 14'ünde (%46,67) lenf nodu tutulumu görülürken, 3 hastada (%10) yüksek differasyon derecesi, 10 hastada (%33,3) metastaz görülmüştür (Tablo 4.1.-3).

Tablo 4.1-1: Çalışmaya katılanların demografik özellikleri

		Toplam		Malign		Premalin		Sağlıklı	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Yaş ortalaması		51,7		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 4.1-2. Premalin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri

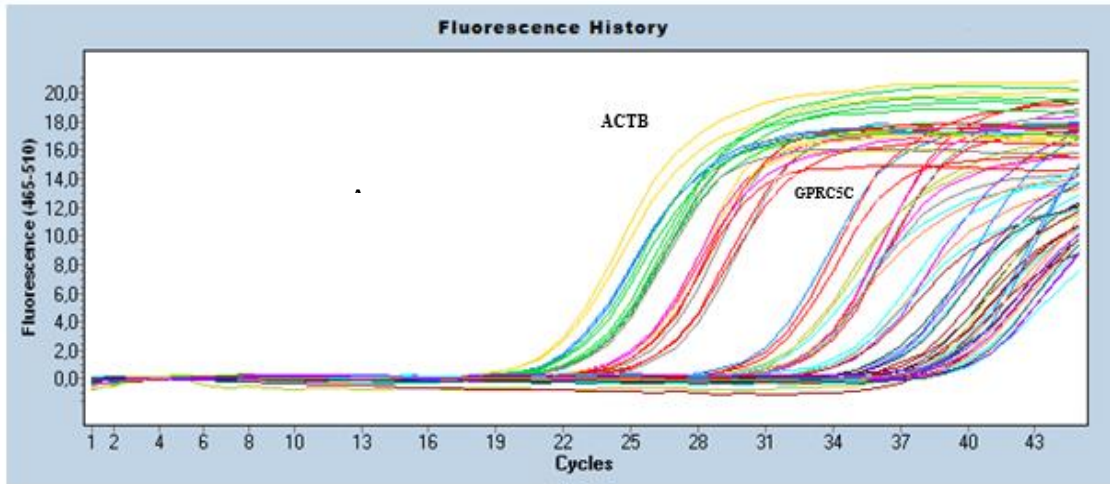
		N (%)
Cinsiyet	Kadın	15/30 (%50)
	Erkek	15/30 (%50)
Yaş	≤50	17/30 (%56,67)
	>50	13/30 (%43,3)
Patoloji	OL	10/30 (%33,33)
	OLD	7/30 (%23,3)
	LP	13/30 (%43,33)
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13/30 (10%)
	Var (+)	17/30 (90%)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	34 (68%)
	Var (+)	6/30 (%20)

Tablo 4.1-3. Malin hasta grubunun klinik ve patolojik bilgileri

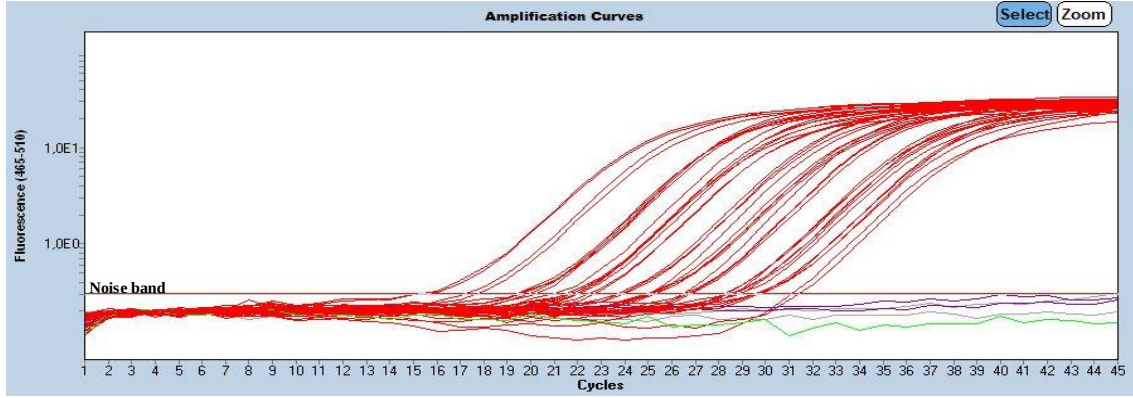
		N (%)
Cinsiyet	Kadın	8/30 (%26,67)
	Erkek	22/30 (%73,33)
Yaş	≤50	8/30 (%30)
	>50	22/30 (%70)
Anatomik Tutulum	Dil	10/30 (%33,33)
	Bukkal Mukoza	6/30 (%20)
	Inferior Alveolar Arkus	3/30 (%10)
	Ağız Tabanı	5/30 (%16,67)
	Retromolar Trigon	4/30 (%13,33)
	Sert Damak	2/30 (%6,67)
Sigara Tüketimi	Yok	10/30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

4.2. GPRC5C Geninin Ekspresyon Analizinin Sonuçları

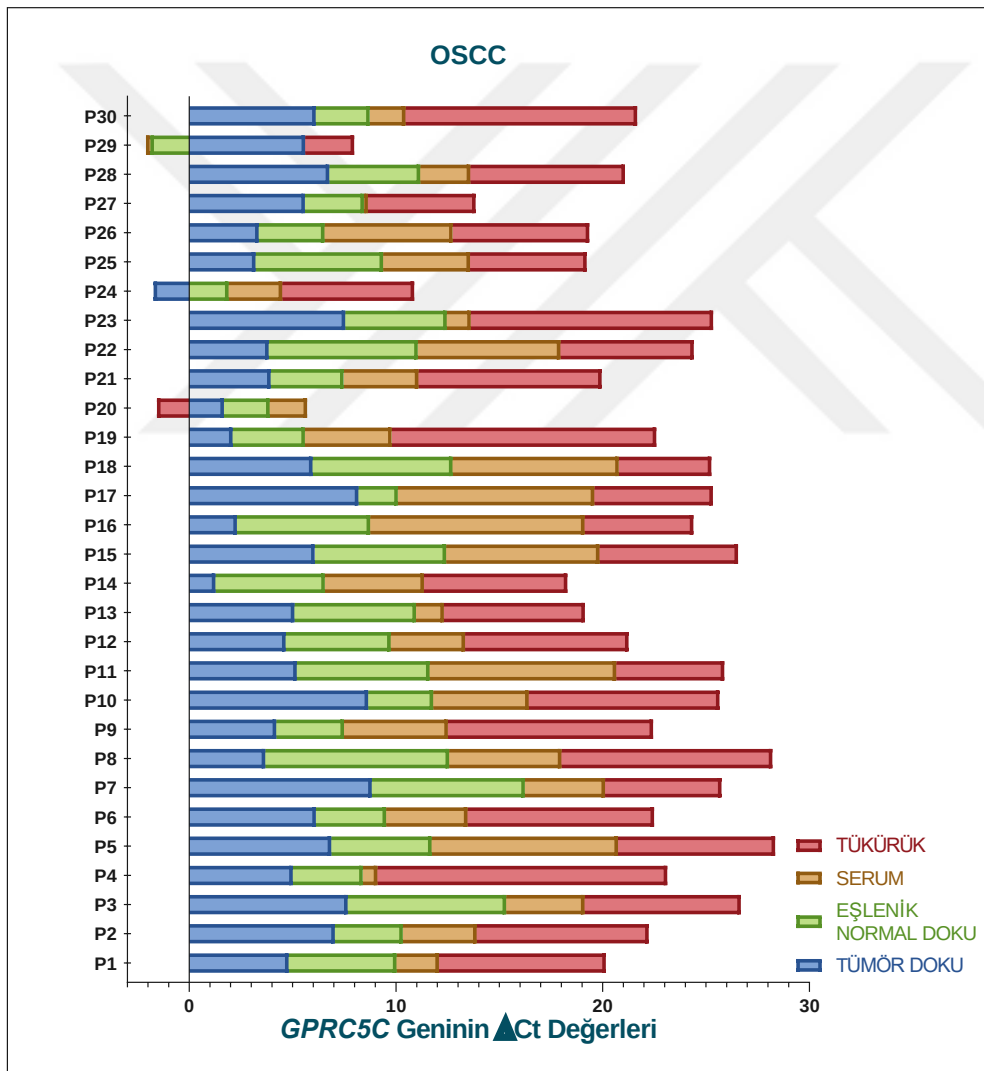
Çalışmamızda OSCC ve OPML tanısı almış 30'ar hastaya ait tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örnekleri ile 15 sağlıklı bireyin normal doku, serum ve tükürük örnekleri kullanılmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerin örneklerinde ekspresyon seviyeleri, QRT-PCR tekniği kullanılarak incelendi (Şekil 4.2-1). Sonrasında hedef gen ve referans (*ACTB*) genlerinin ekspresyon sonuçlarından elde edilen Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri tüm örnekler için normalize edildi. Sonuçların analizi LightCycler 480 yazılımındaki Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile yapılmıştır (Şekil 4.2-2). OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusu, eşlenik normal doku, serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylere ait normal mukoza, serum ve tükürük örneklerindeki *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeyleri ile referans genin (*ACTB*) ekspresyon düzeylerinin ΔC_t değerleri hesaplandı (Şekil 4.2-3,4.2-4,4.2-5). OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusunun ΔC_t değerlerinin normal dokunun ΔC_t değerlerine göre kat değişimleri (fold change) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplanmıştır (Şekil 4.2-6). 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 değerlendirildi. OPML ve OSCC hastalarına ait tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon azalışı veya artışı ile hastalara ait klinikopatolojik bilgilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması IBM SPSS Statistics 20 programı yardımıyla gerçekleştirildi.



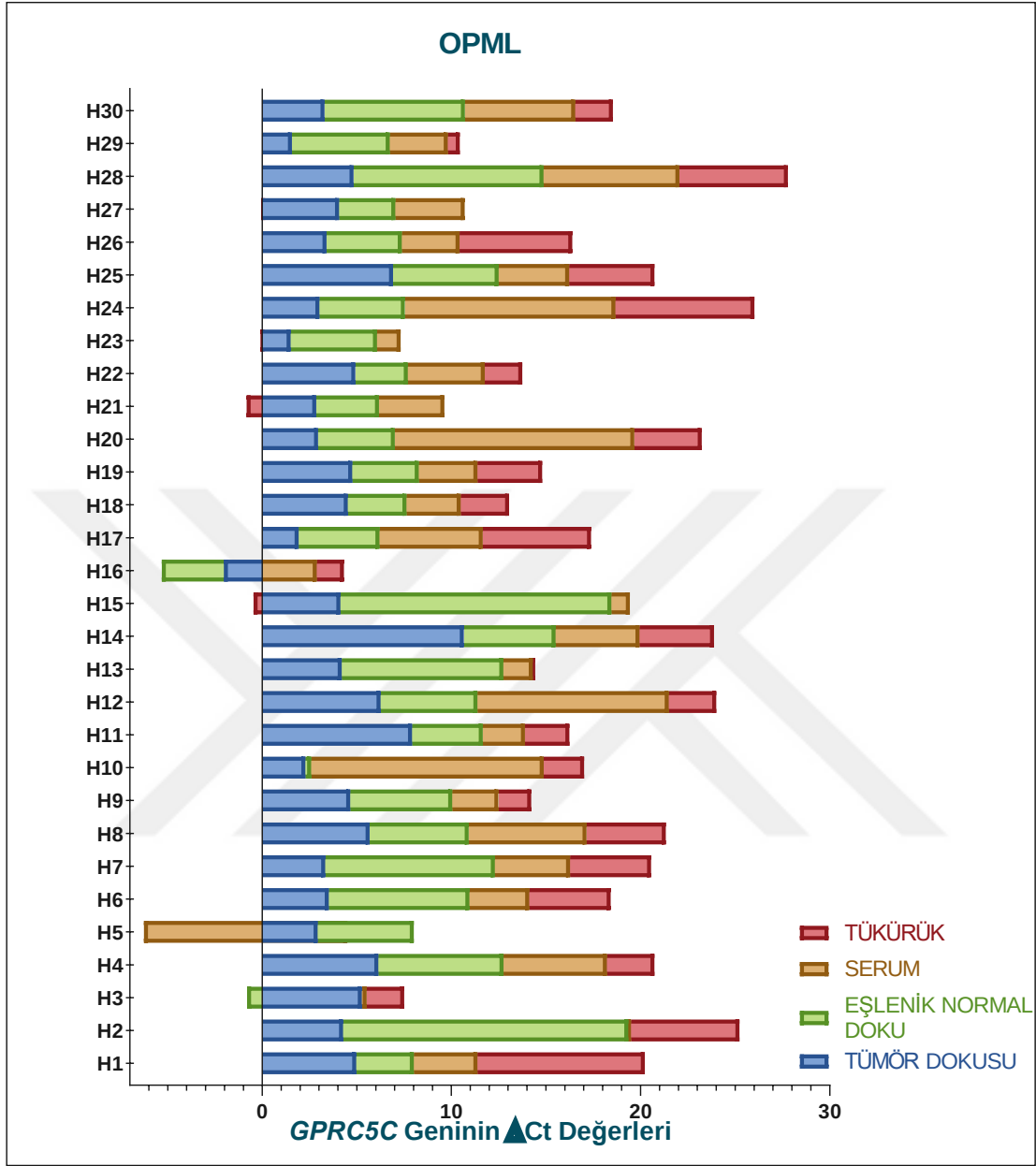
Şekil 4.2-4 : Hastalara ait örneklerin hedef gen (*GPRC5C*) ve referans gendeki (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri



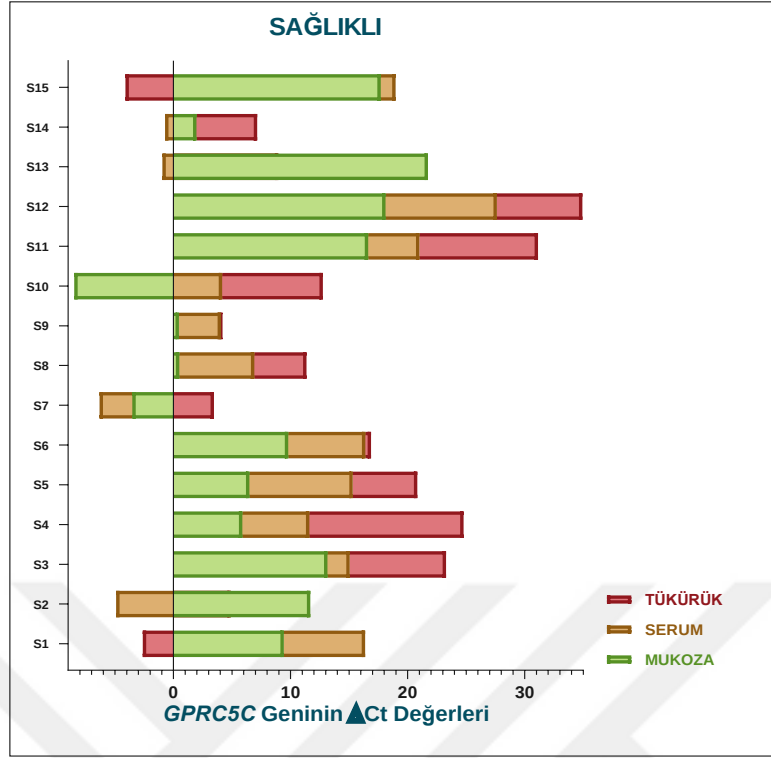
Şekil 4.2-2: Hastalara ait örneklerin hedef gen (*GPRC5C*) ve referans gendeki (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri analiz aşamasında threshold gösterimi



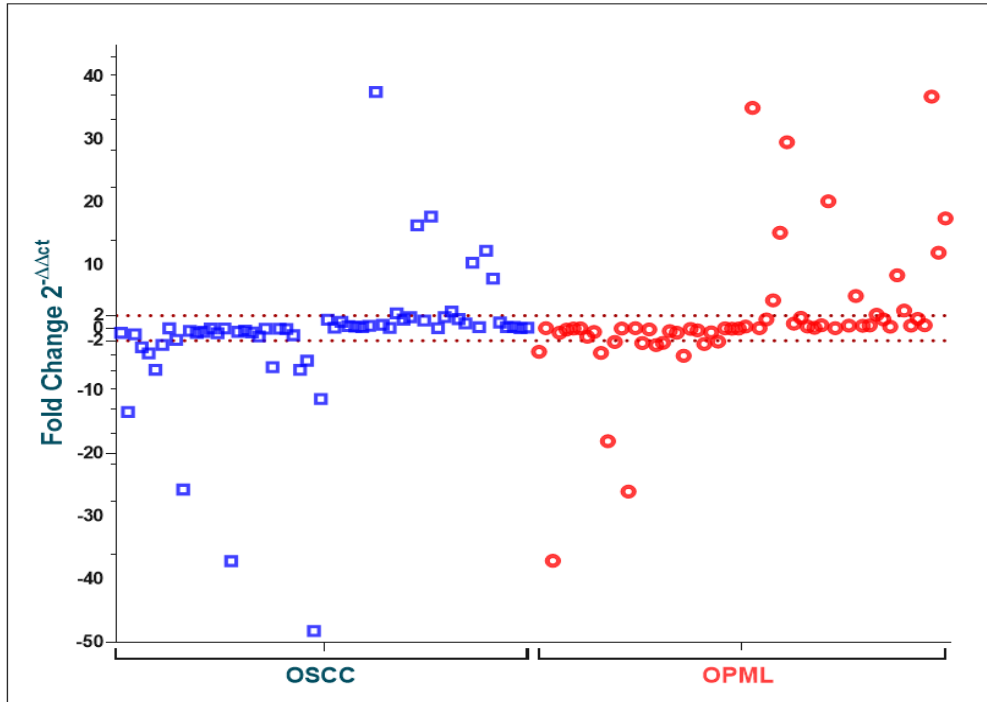
Şekil 4.2-3: OSCC hastalarının tümör/eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin ΔC_t değerleri (P:OSCC hasta kodlaması, Kırmızı: Tükürük örneklerinin ΔC_t değerleri, Turuncu: Serum Örneklerinin ΔC_t değerleri, Yeşil: Eşlenik Normal Doku Örneklerinin ΔC_t değerleri, Mavi: Tümör Doku Örneklerinin ΔC_t değerleri).



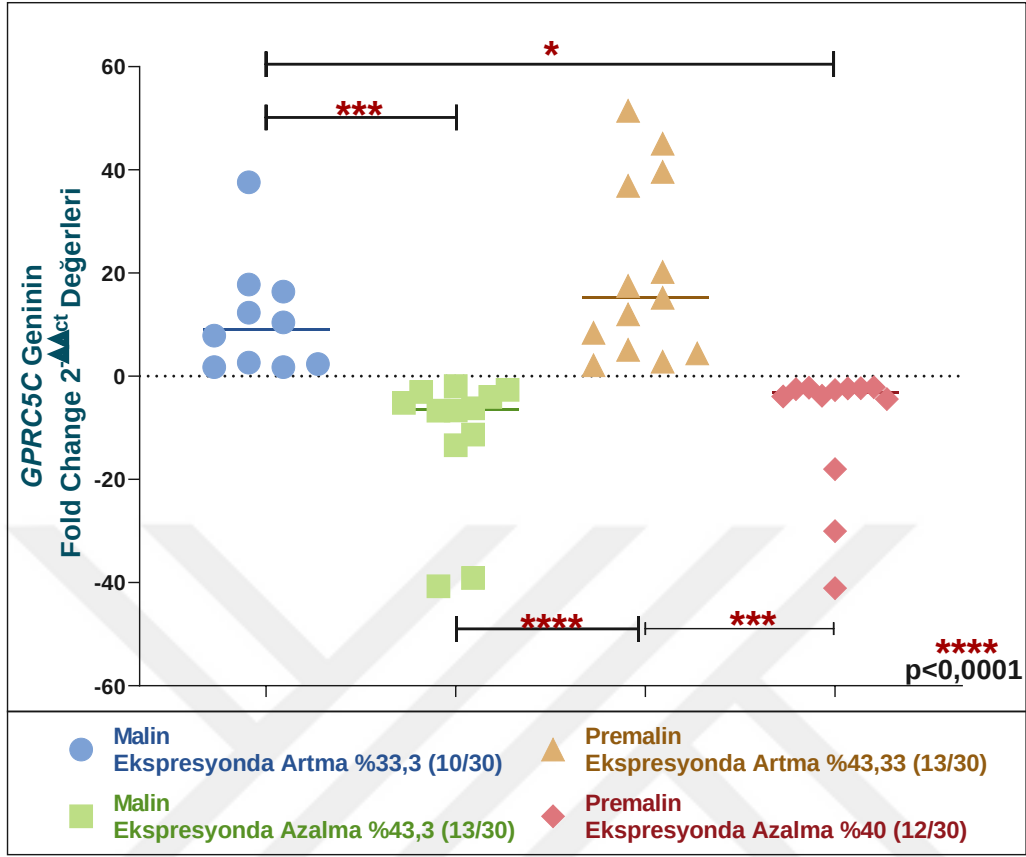
Şekil 4.2-4: OPML hastalarının tümör, eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin Δ Ct değerleri (H: OPML hasta kodlaması, Kırmızı: Tükürük örneklerinin Δ Ct değerleri, Turuncu: Serum Örneklerinin Δ Ct değerleri, Yeşil: Eşlenik Normal Doku Örneklerinin Δ Ct değerleri, Mavi: Tümör Doku Örneklerinin Δ Ct değerleri).



Şekil 4.2-5: Sağlıklı bireylerin normal mukozal, serum ve tükürük örneklerinin ekspresyon seviyelerinin Δ Ct değerleri (S:Sağlıklı birey, Kırmızı: Tükürük örneklerinin Δ Ct değerleri, Turuncu: Serum Örneklerinin Δ Ct değerleri, Yeşil: Mukoza Örneklerinin Δ Ct değerleri).

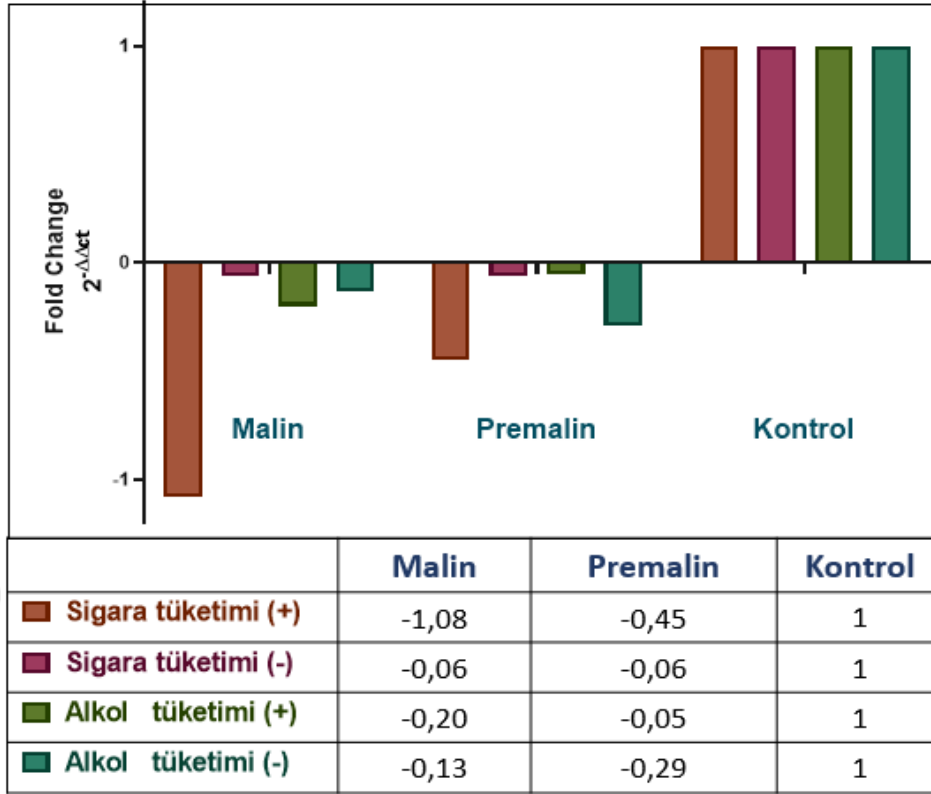


Şekil 4.2-6: OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokusunun Δ Ct değerlerinin eşlenik normal dokunun Δ Ct değerlerine göre kat değişim(fold change) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri (Mavi: OSCC hasta grubu, Kırmızı: OPML hasta grubu).



Şekil 5.2-7: OSCC ve OPML hastalarına ait tümör dokularında eşlenik normal dokularına göre relatif olarak hesaplanan ekspresyon düzeylerinin artma ve azalma oranları ($p<0,0001$). (Mavi: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde artma, Pembe: Premalin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde azalma, Turuncu: Premalin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde artma, Yeşil: Malin hasta grubunda ekspresyon seviyesinde azalma, *: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi)

OSCC hastaların %43,3'ünde (13/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde azalma ve %33,3'ünde (10/30) ekspresyon seviyesinde artma gözlenirken 7 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.2-7). OPML hastaların %43,33'ünde (13/30) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla ekspresyon seviyesinde artma ve %40'ında (12/30) ekspresyon seviyesinde azalma gözlenirken 5 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.2-7). OSCC grubunda ekspresyon seviyesindeki artış ve azalma arasında "0,0016" p değeri olan istatistiksel anlamlılık görüldü. OPML grubundaki ekspresyon seviyesindeki artma ve azalma arasında anlamlılık gözlemlenmiştir ($p=0,0005$).



Şekil 6.2-8: OSCC ve OPML hastalarına ait tümörlerde kendi eşlenik normal dokularına ve sağlıklı bireylere ait normal dokulara göre ekspresyon seviyelerindeki değişim ile sigara ve alkol tüketimi arasındaki ilişkinin gösterimi.

Şekil 4.2-8’de gösterilen grafikte, sigara tüketimi olan malin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, sigara içen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 1,08 kattıyken, sigara tüketimi olmayan malin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, sigara içmeyen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,06 kattır. Sigara tüketimi olan premalin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, sigara içen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,45 kattıyken, sigara tüketimi olmayan premalin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, sigara içmeyen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,06 kattır. Alkol tüketimi olan malin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, alkol tüketimi olan sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,20 kattır. Alkol tüketimi olan premalin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, Alkol içen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,05 kattır. Alkol tüketimi olmayan malin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, Alkol içmeyen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,13 kattır. Alkol tüketimi olmayan premalin hasta grubundaki ekspresyonda azalma katsayısı, alkol içmeyen sağlıklı kişilerdeki ekspresyonda azalmaya göre 0,29 kattır.

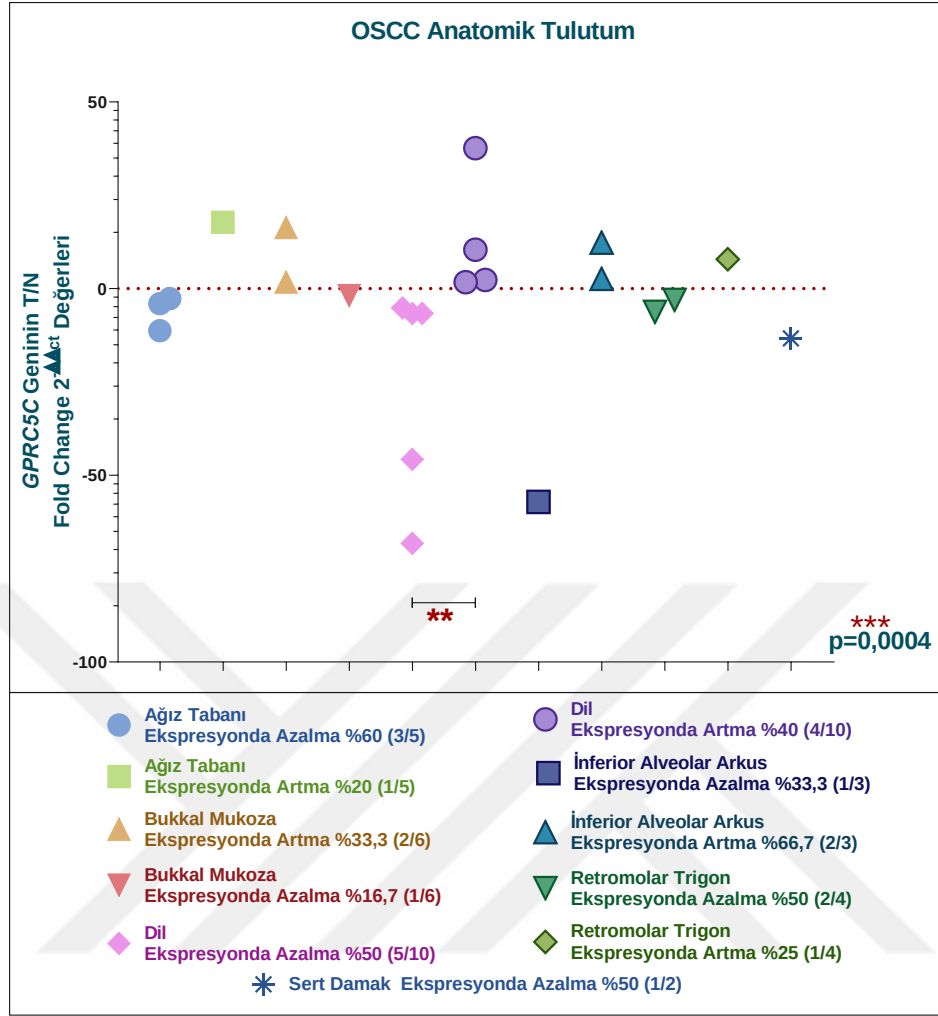
Tablo 4.2-1: OSCC/OPML hasta gruplarının tümör, eşlenik normal dokuları ile serum ve tükürük örnekleri ile sağlıklı bireylerin mukoza, serum ve tükürük örneklerinin foldchange değerleri.

	Tümör Dokusu & Sağlıklı Mukoza	Eşlenik Normal Doku & Sağlıklı Mukoza	Serum Örneği & Sağlıklı Serum Örneği	Tükürük Örneği & Sağlıklı Tükürük Örneği
OSCC	-0,11	-0,08	-2,05	-5,79
OPML	-0,06	-0,13	-1,96	-0,26

OSCC hastaların tümör dokularına ait Ct değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait Ct değerlerinin ortalamaları kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı. Hastalarda sağlıklı bireylere göre *GPRC5C* geninin -0,11466 kat ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, OSCC hastalarının eşlenik normal dokularında sağlıklı mukozaya göre -0,08 kat, OSCC hastalarının serum örneklerinde sağlıklı serum örneklerine göre -2,05 kat, OSCC hastalarına ait tükürük örneklerinde sağlıklı tükürük örneklerine göre -5,79 kat ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmiştir (Tablo 4.2-1).

OPML OPML tümörlerinde sağlıklı mukozaya göre -0,06462 kat ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmiştir. OPML hasta grubunun eşlenik normal dokularında sağlıklı mukozaya göre -0,13005 kat, OPML grubuna ait serum örneklerinde sağlıklı serum örneklerine göre -1,96099 kat, OPML grubuna ait tükürük örneklerinde sağlıklı tükürük örneklerine göre -0,25643 kat ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmiştir (Tablo 4.2-1).

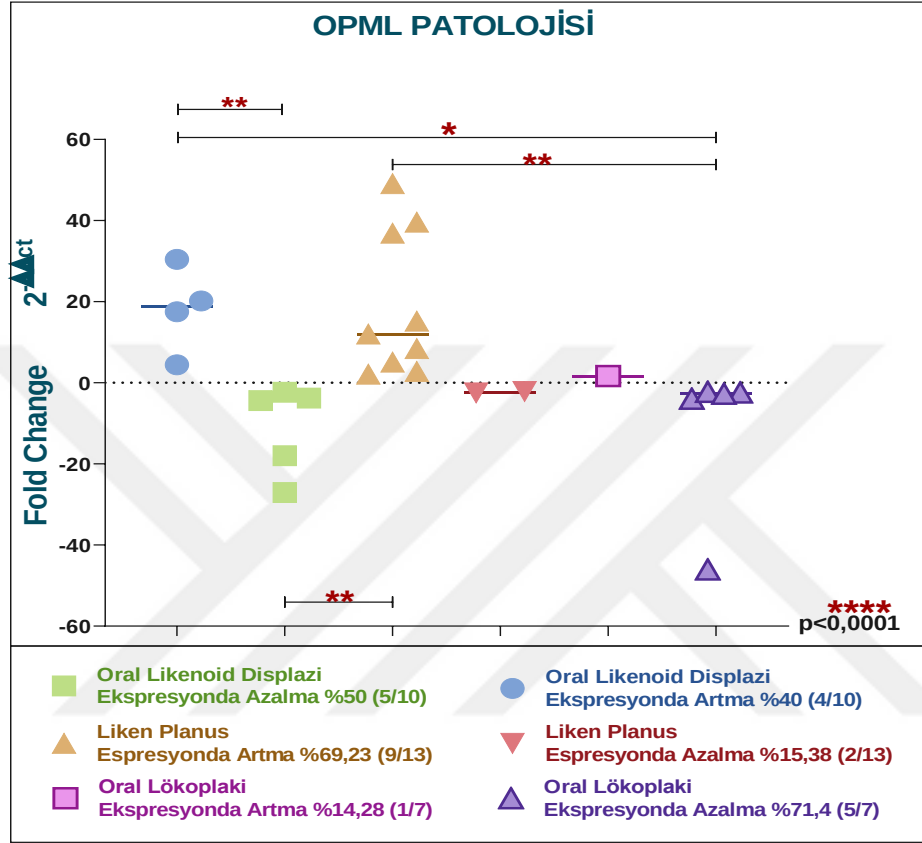
Metilasyon gözlenen OSCC hastalarının tümör dokusu örneklerinde sağlıklı bireylere oranla genin ekspresyonunda -0,5364 kat, metilasyon gözlenen OPML hastalarının tümör dokusu örneklerinde sağlıklı bireylere oranla genin ekspresyonunda -2,265 kat azalma saptadı.



Şekil 4.2-9: OSCC hastalarının anatomik tutulumuna göre *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeyleri (p=0,0020) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

Şekil 4.2-9'da malin hasta grubunun anatomik tutulum bölgelerine göre ekspresyon seviyesinde artma ve azalma görülen hastalar gösterilmektedir (p=0,0004). Ağız tabanı bölgesinde tutulum gösteren 5 hastanın 3'ünde (%60) ekspresyonda azalma, 1'inde (%20) ekspresyonda artma gözlemlenirken, bir hastanın ekspresyon seviyesinde ise değişiklik gözlemlenmemiştir. Bukkal tümörlü 6 hastanın 1'inde (%16,7) ekspresyonda azalma, 2 hastanın (%33,3) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlenirken, 3 hastanın ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Dil tümörüne sahip 10 hastanın 5'inde (%50) ekspresyonda azalma, 4'ünde (%40) ekspresyonda artma gözlemlenirken, diğer 1 hastanın ekspresyon seviyelerinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Inferior Alveolar arkus tutulumu gösteren 3 hastanın 1'inde (%33,3) ekspresyonda azalma görülürken 2'sinde (%66,7) ekspresyonda artış gözlemlenmiştir. Retromolar trigon bölgesinde anatomik tutulum gösteren 4 hastanın 2'sinde (%50) ekspresyonda azalma gözlemlenirken 1'inde (%25) ekspresyonda

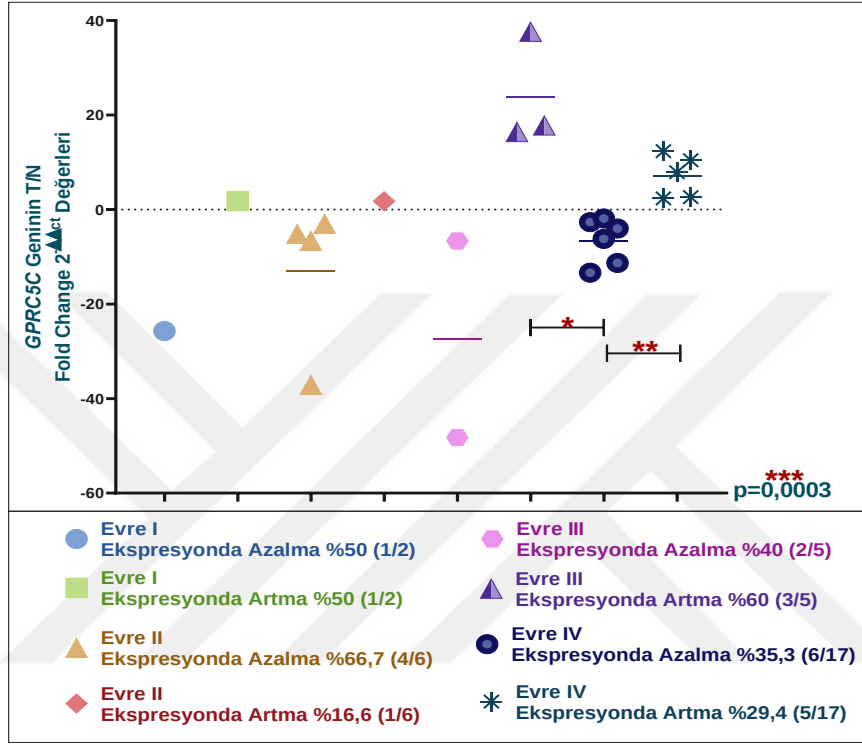
artış gözlemlenmiştir. Sert damak tümörlü 2 hastanın 1'inde (%50) ekspresyonda azalma gözlemlenmiştir. Yapılan One-way ANOVA analizi ile dil bölgesinde tutulum gösteren hastaların azalan ve artma ekspresyon seviyeleri arasında anlamlılık olduğu görülmüştür ($p=0,025^{**}$).



Şekil 4.2-10: Premalin hasta grubunun patolojik gruplarına göre *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler ($p<0,0001$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

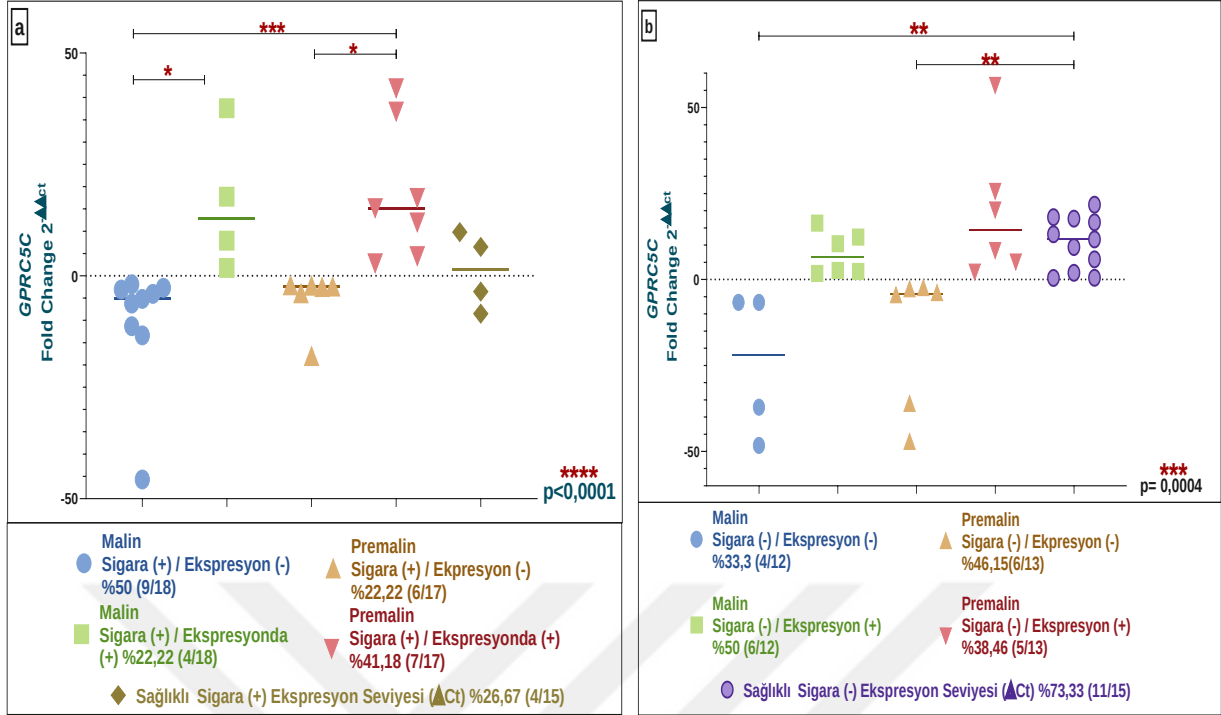
Şekil 4.2-10'da premalin hasta grubunun patolojisine göre ekspresyon seviyesinde artma ve azalma görülen hasta sayılarını gösterilmektedir ($p<0,0001$). Oral Lökoplaki (OL) patolojisi gösteren 7 hastanın 5'inde (%71,4) ekspresyonda azalma, diğer 2 hastada (%28,6) ekspresyonda artma gözlemlenmemiştir. Liken Planus (LP) patolojisi gösteren 13 hastanın 2'sinde (%15,38) ekspresyonda azalma, 9'unda (% 69,23) ekspresyonda artma gözlemlenirken, diğer 2 hastanın ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Oral Likenoid Displazi (OLD) patolojisi gösteren 10 hastanın 5'inde (%50) ekspresyonda azalma, 4'inde (%40) ekspresyonda artma gözlemlenirken, diğer bir hastanın ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Yapılan One-way ANOVA analizine göre OLD ekspresyonda azalma gösteren hastalar ile artma gözlemlenen hastalar arasında

($p=0,0061$), OLD ekspresyonda artma görülen hastalar ile OL ekspresyonda azalma görülen hastalar arasında ($p=0,0195$), OLD ekspresyonda azalma görülen hastalar arasında LP ekspresyonda artma görülen hastalar arasında ($p=0,0011$), LP ekspresyonda artma görülen hastalar arasında ile OL ekspresyonda azalma görülen hastalar arasında ($p=0,0049$) anlamlılık gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2-11: Malin hasta grubunun evrelere göre *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler ($p=0,0083$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

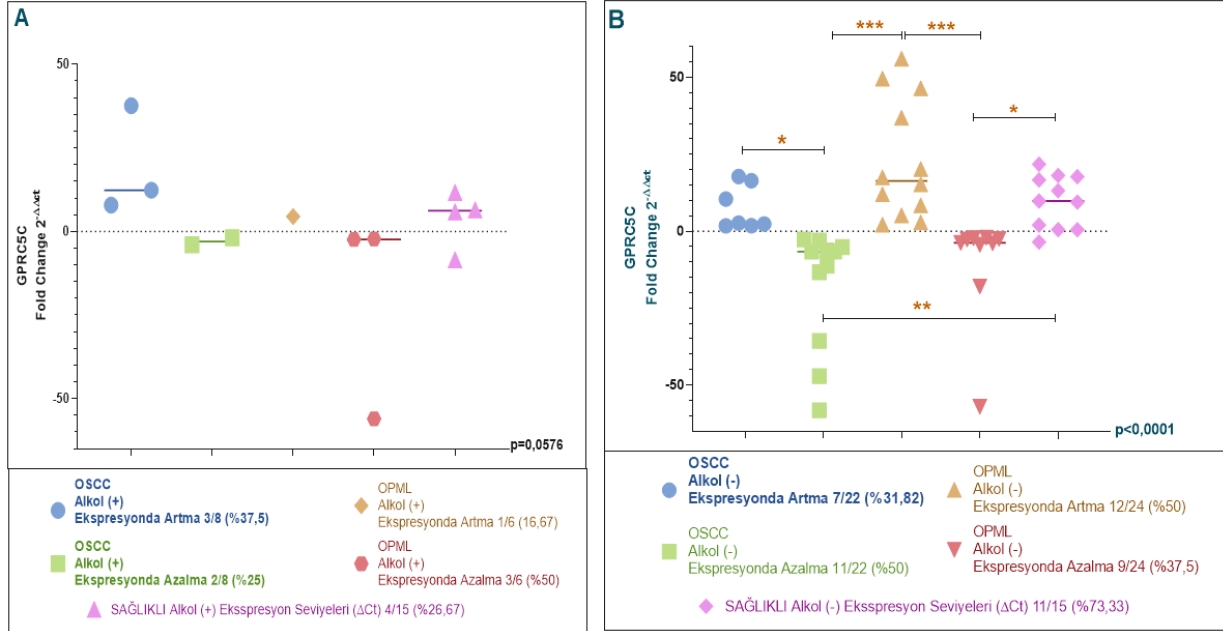
Şekil 4.2-11’de malin hasta grubunun evrelere göre *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerindeki artma ve azalma görülen hasta sayıları gösterilmiştir ($p=0,0003$). Evre I olan 2 hastanın 1’inde (%50) ekspresyonda azalma gözlemlenirken, diğer hastanın ekspresyon seviyesinde artma gözlemlenmiştir. Evre II olan 6 hastanın 4’ünde (%66,7) ekspresyon seviyesinde azalma, 1 hastanın (%16,6) ekspresyon seviyesinde artma gözlemlenirken, diğer 1 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Evre III olan 5 hastanın 2’sinde (%40) ekspresyonda azalma, diğer 3 hastada (%60) ise ekspresyonda artma gözlemlenmiştir. Evre IV olan 17 hastanın 6’inde (%35,3) ekspresyonda azalma, 5’inde (%29,4) ekspresyonda artma gözlemlenirken, diğer 6 hastanın ekspresyon seviyelerinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.2-12: Sigara kullanımı ile ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (a) Klinik parametrelerden sigara içen malin ve premalin hasta grubuyla sağlıklı grubun *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin gösterimi ($p=0,0070$). (b) Klinik parametrelerden sigara içmeyen malin hasta grubunda *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin gösterimi ($p=0,0011$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

Şekil 4.2-12’de sigara içen/içmeyen malin ve premalin hasta grubunda ve sağlıklı grupta *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerindeki artma ve azalma seviyeleri gösterilmiştir ($p<0,0001$; $p=0,0004$). Şekil 4.2-12-a’da Malin hasta grubunda sigara içen 18 hastanın 9’unda (%50) ekspresyonda azalma, 4’ünde (%22,22) ekspresyonda artma gözlemlenirken, 5 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Premalin hasta grubunda sigara içen 17 hastanın 6’sında (%22,22) ekspresyonda azalma, 7’sinde (%41,18) ekspresyonda artma gözlemlenirken, 4 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir ($p<0,0001$). One-way ANOVA analizine göre malin ekspresyonda artma ile malin ekspresyonda azalma arasında ($p=0,0104^*$), premalin ekspresyonda artma ile premalin ekspresyonda azalma arasında ($p=0,0462^*$), malin ekspresyonda azalma ile premalin ekspresyonda artma arasında ($p=0,0006^{***}$) anlamlılık görülmüştür. Şekil 4.2-12-b’de Malin hasta grubunda sigara içmeyen 17 hastanın 4’sında (%33,3) ekspresyonda azalma, 6’sında (%50) ekspresyonda artma gözlemlenirken, 2 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Premalin hasta grubunda sigara içmeyen 13 hastanın 6’sında (%46,15) ekspresyonda azalma, 5’inde (%38,46) ekspresyonda artma gözlemlenirken, 1 hastanın

ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Yapılan One-way ANOVA analizine göre malin ekspresyonda azalma ile sağlıklı arasında ($p=0,0095^{**}$), premalin ekspresyonda azalma ile sağlıklı arasında ($p=0,0035^{**}$) anlamlılık görülmüştür.



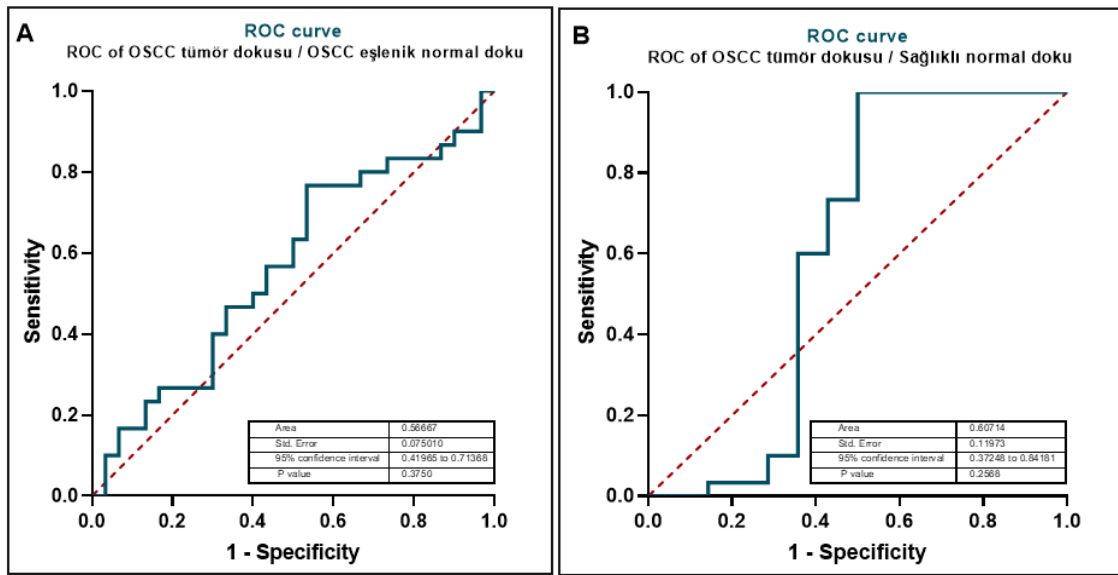
Şekil 4.2-13: Alkol tüketimi ile ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (a) Klinik parametrelerden alkol tüketen malin ve premalin hasta grubuyla sağlıklı grubun *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin gösterimi ($p=0,0576$). (b) Klinik parametrelerden alkol tüketmeyen malin hasta grubunda *GPRC5C* geninin ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin gösterimi ($p<0,0001$) (*: Gruplar arasındaki anlamlılık derecesi).

Şekil 4.2-13'te alkol tüketimine bağlı olarak malin/premalin hasta grubunda ve sağlıklı grupta *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerindeki artma ve azalma seviyeleri gösterilmiştir ($p=0,0567$; $p<0,0001$). Şekil 4.2-13 (a)'da Malin hasta grubunda alkol tüketen 8 hastanın 3'ünde (%37,5) ekspresyonda artma, 2'sinde (%25) ekspresyonda azalma gözlemlenirken, 3 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Premalin hasta grubunda alkol tüketen 6 hastanın 1'inde (%16,67) ekspresyonda artma, 3'ünde (%50) ekspresyonda azalma gözlemlenirken, 2 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir ($p=0,0567$). Şekil 4.2-13 (b)'de Malin hasta grubunda alkol tüketmeyen 22 hastanın 7'sinde (%31,82) ekspresyonda artma, 11'inde (%50) ekspresyonda azalma gözlemlenirken, 4 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Premalin hasta grubunda alkol tüketmeyen 24 hastanın 12'sinde (%50) ekspresyonda artma, 9'unda (%37,5) ekspresyonda azalma gözlemlenirken, 3 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. %95 güven aralığında One-way ANOVA analizine göre malin ekspresyonda azalma ile sağlıklı arasında ($p=0,0018^{**}$), premalin ekspresyonda azalma ile

sağlıklı arasında ($p=0,0451^*$), malin ekspresyonda azalma ile artma arasında ($p=0,0298^*$), premalin ekspresyonda artma ile azalma arasında ($p=0,0005^{***}$), premalin ekspresyonda artma ile malin ekspresyonda azalma arasında ($p=0,0002^{***}$) anlamlılık görülmüştür.

Tablo 4.2-2 ve Tablo 4.2-3’de standart curve eğrisi koordinatları, duyarlılık ve ekspresyon değerlerinin denk geldiği eşik değerleri belirtilmiştir.

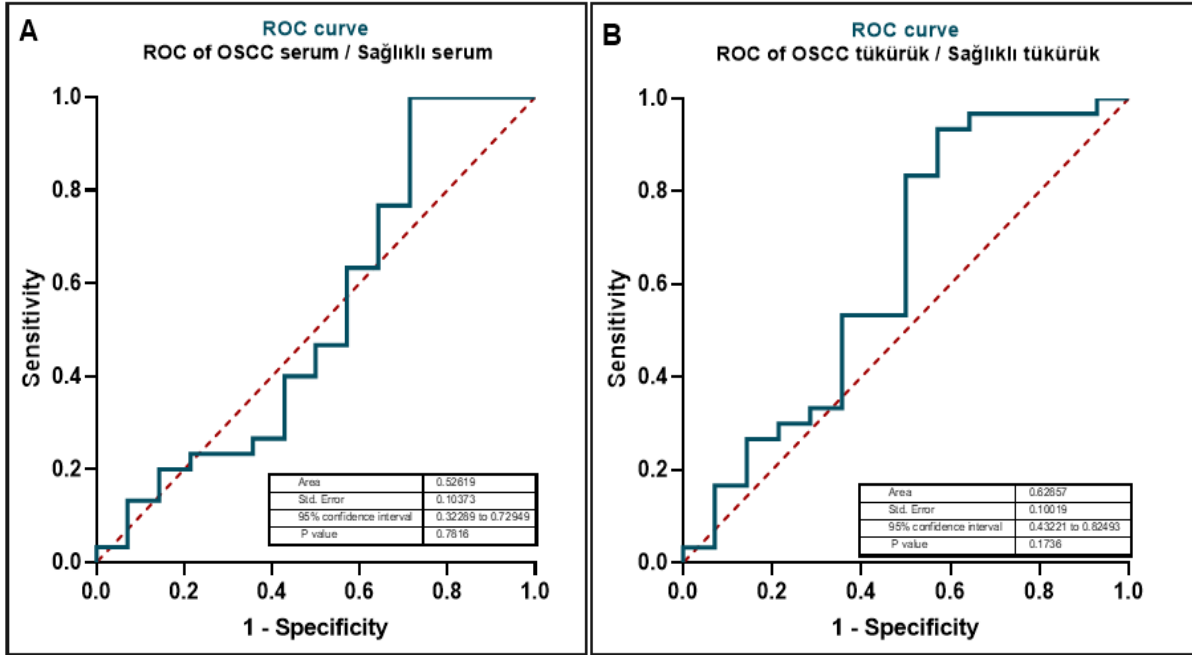
Malin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %3,4 duyarlılık %100 özgüllük ile özgüllüğü yüksek ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-2’e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 8,5 olarak belirlenebilir. Malin grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %100 duyarlılık %92,5 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-2’e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 2,5 olarak belirlenebilir (Şekil 4.2-14).



Şekil 4.2-14: OSCC grubuna ait doku örneklerinin ROC analizi. (A) Malin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

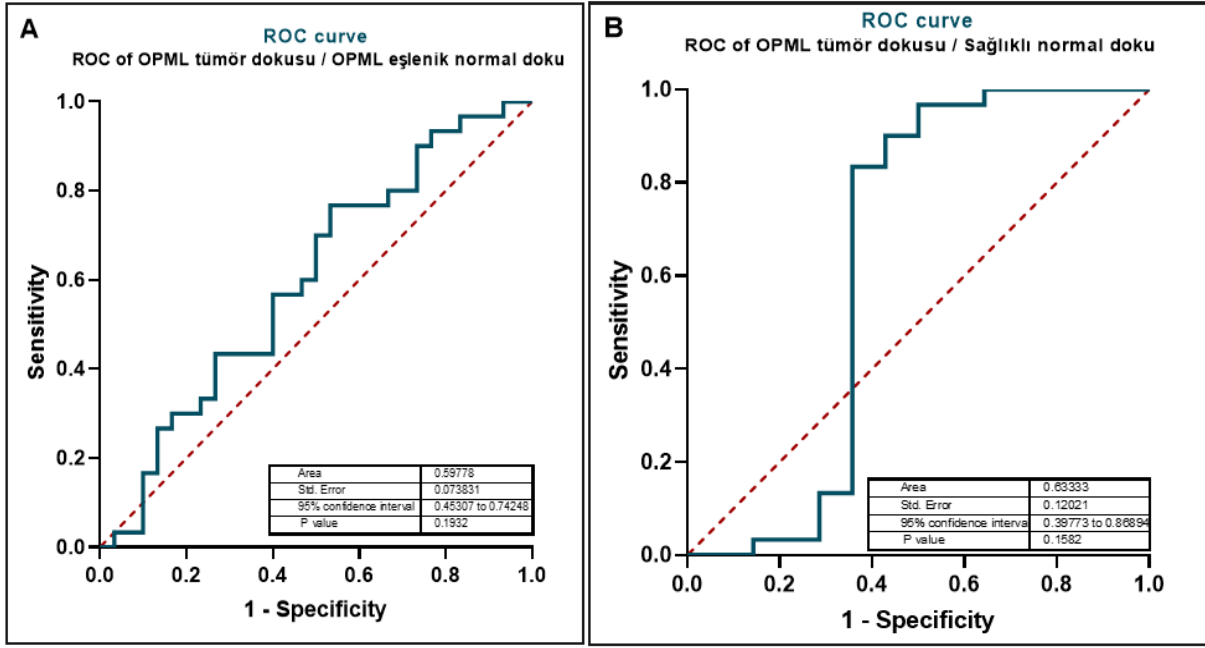
Malin grubunda serum örnekleri ile sağlıklı grubunun serum örneklerinde *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %37,5 duyarlılık %14,3 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-3’e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 5,5 olarak

belirlenebilir. Malin grubunda tükürük örnekleri ile sağlıklı grubunun tükürük örneklerinde *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %33,3 duyarlılık %25 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-3'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 8,5 olarak belirlenebilir (Şekil 4.2-15).



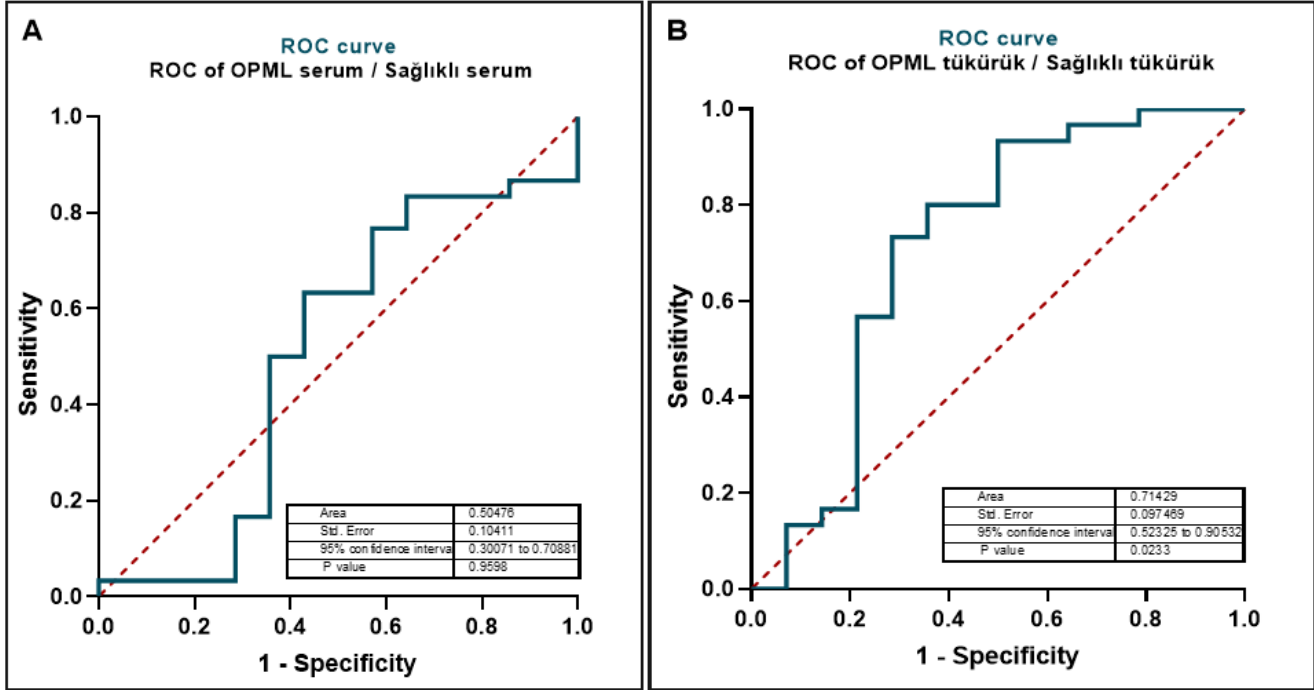
Şekil 4.2-15: OSCC vücut sıvı örneklerinin ROC analizi. (A) Malin grubunda serum ile sağlıklı serum *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Malin grubunda serum ile sağlıklı serum *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

Premalin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %100 duyarlılık %93,1 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-2'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 1,5 olarak belirlenebilir. Premalin grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %100 duyarlılık %53,8 özgüllük ile özgüllüğü düşük ve duyarlılığı yüksek bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-2'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 4,5 olarak belirlenebilir (Şekil 4.2-16).



Şekil 4.2-16: OPML grubunun doku örneklerinin ROC analizi (A) Premalin grubunda tümör ile eşlenik normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Premalin grubunda tümör ile sağlıklı normal dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

Premalin grubunda serum örnekleri ile sağlıklı grubunun serum örneklerinde *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %50 duyarlılık %50 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-3'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 3,5 olarak belirlenebilir. Premalin grubunda tükürük örnekleri ile sağlıklı grubunun tükürük örneklerinde *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması sonucunda %38,9 duyarlılık %50 özgüllük ile özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir test olduğu görülmektedir. Tablo 4.2-3'e göre duyarlılık ve özgüllük değerlerinin karşılık geldiği eşik değeri (cut-off point) 3,5 olarak belirlenebilir (Şekil 4.2-17).



Şekil 4.2-17: OPML grubunun vücut sıvı örneklerinin ROC analizi (A) Premalin grubunda serum ile sağlıklı serum *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi. (B) Premalin grubunda serum ile sağlıklı serum *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyelerinin ROC analizi.

Tablo 4.2-2: OSCC ve OPML gruplarındaki Tümör-Eşlenik Normal-Sağlıklı Dokularında *GPRC5C* geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri

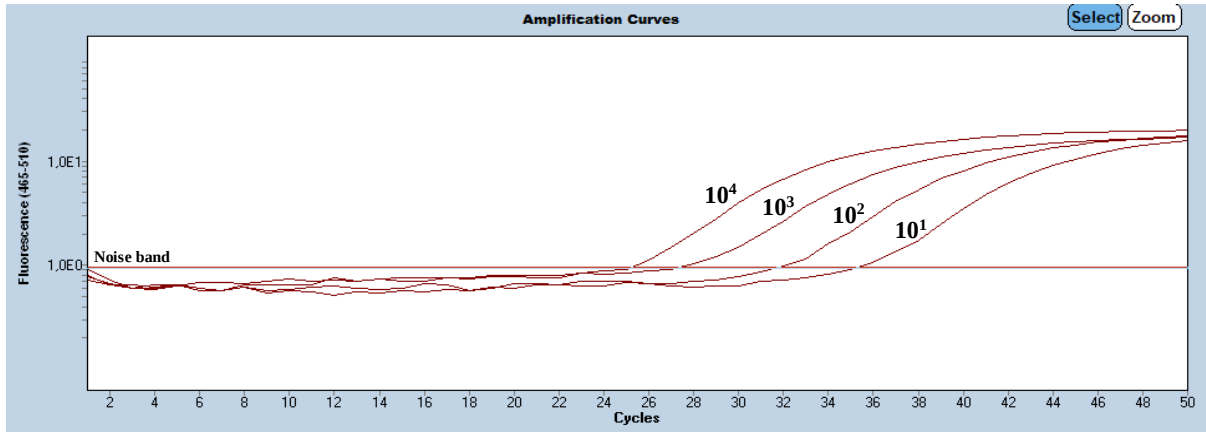
	Tümör Dokusu / Eşlenik Normal Doku			Tümör Dokusu / Sağlıklı Normal Doku		
	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgünlük	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgünlük
OSCC	8,5	3,4	100	2,5	100	92,3
OPML	1,5	100	93,1	4,5	100	53,8

Tablo 4.2-3: OSCC ve OPML gruplarındaki Serum-Tükürük örneklerinde *GPRC5C* geninin ekspresyonunun özgüllük ve duyarlılık değerleri

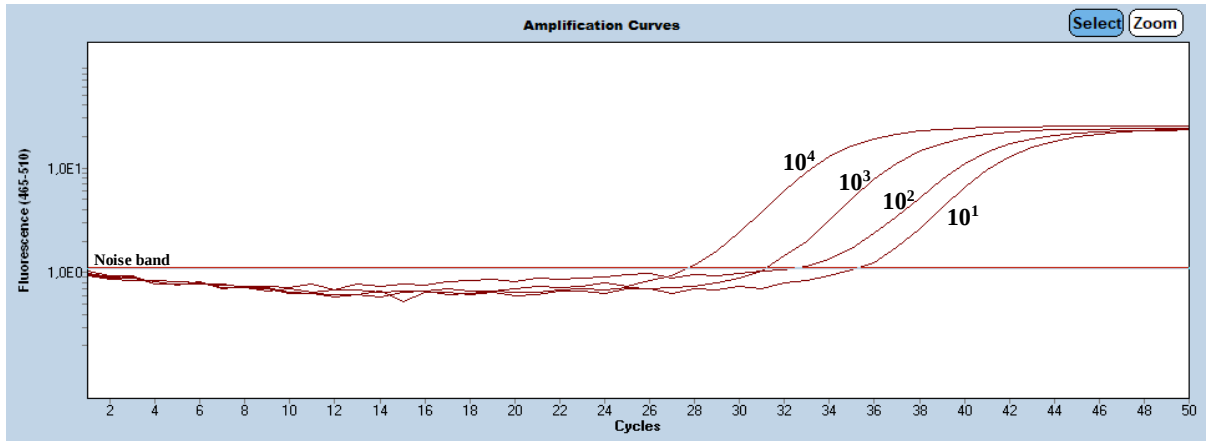
	Serum / Sağlıklı Serum			Tükürük / Sağlıklı Tükürük		
	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgünlük	Eşik Değeri	% Duyarlılık	% Özgünlük
OSCC	5,5	37,5	14,3	8,5	33,3	25
OPML	3,5	50	50	3,5	38,9	50

4.3. GPRC5C Geninin Metilasyon Analizinin Sonuçları

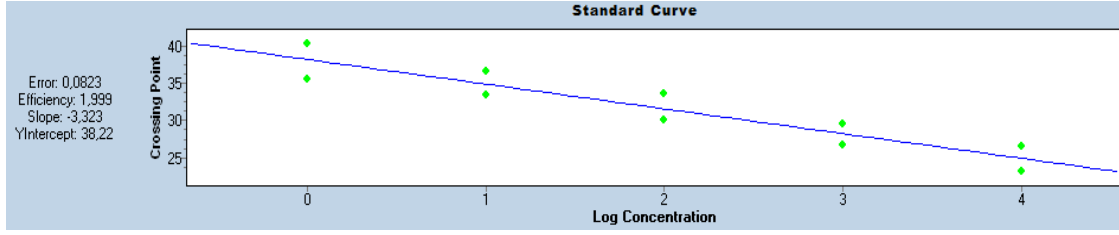
Çalışmamızda OSCC tanısı almış 30 hastaya ve OPML tanısı almış 30 hastaya ait tümör ve eşlenik normal doku örnekleri, kendisinde ve ailesinde malign/benign tümör öyküsü bulunmayan 15 sağlıklı bireyin normal mukoza örneklerinin metilasyon durumu Kantitatif Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (QMSP) ile araştırıldı. Kantitatif ölçüm yapılabilmek için, %100 metillediğimiz standart ve 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) gerçekleştirildi. Hedef genin (*GPRC5C*) amplifikasyon eğrileri Şekil 4.3-1'de ve referans genin (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri Şekil 4.3-2'de , standart curve eğrisi ise Şekil 4.3-3'te gösterilmektedir.



Şekil 4.3-1: Referans genin (*ACTB*) amplifikasyon eğrileri



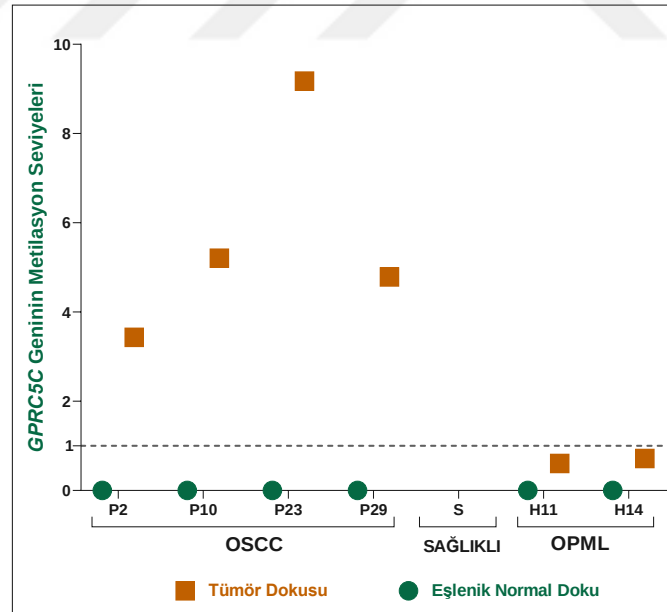
Şekil 4.3-2: Hedef genin (*GPRC5C*) amplifikasyon eğrileri



Şekil 4.3-3: Standart curve eğrisi

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

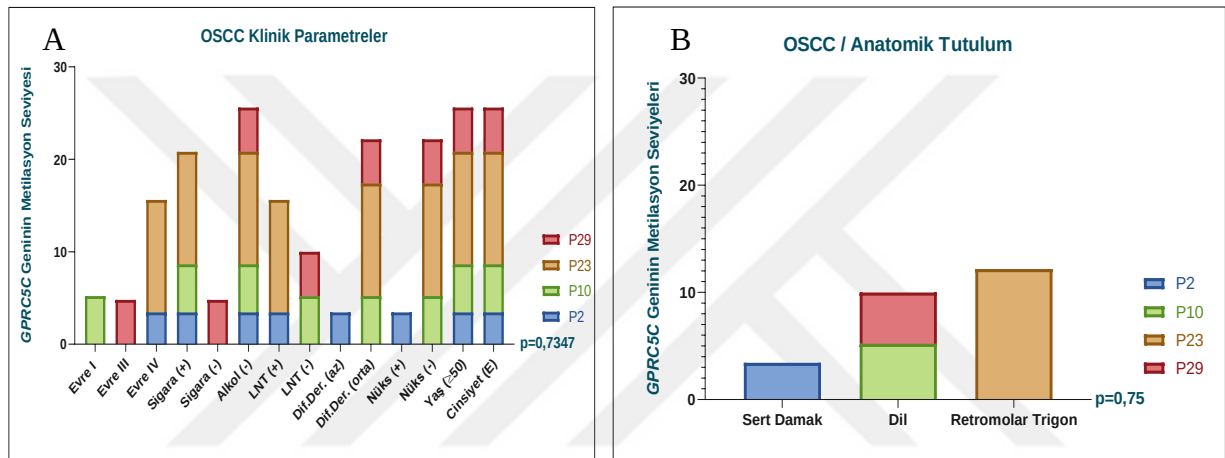
OSCC hastalarında tümör doku örneklerindeki *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon oranı %13,3 (4/30) gözlemlenirken, normal doku örneklerinde *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 4.3.4). OPML hastalarında tümör doku örneklerindeki *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon oranı %6,67 (2/30) gözlemlenirken, normal doku örneklerinde *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 4.3-4).



Şekil 4.3-4: OSCC ve OPML hastalarının tümör ve eşlenik normal dokularında ve sağlıklı dokuda *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarındaki metilasyon seviyeleri

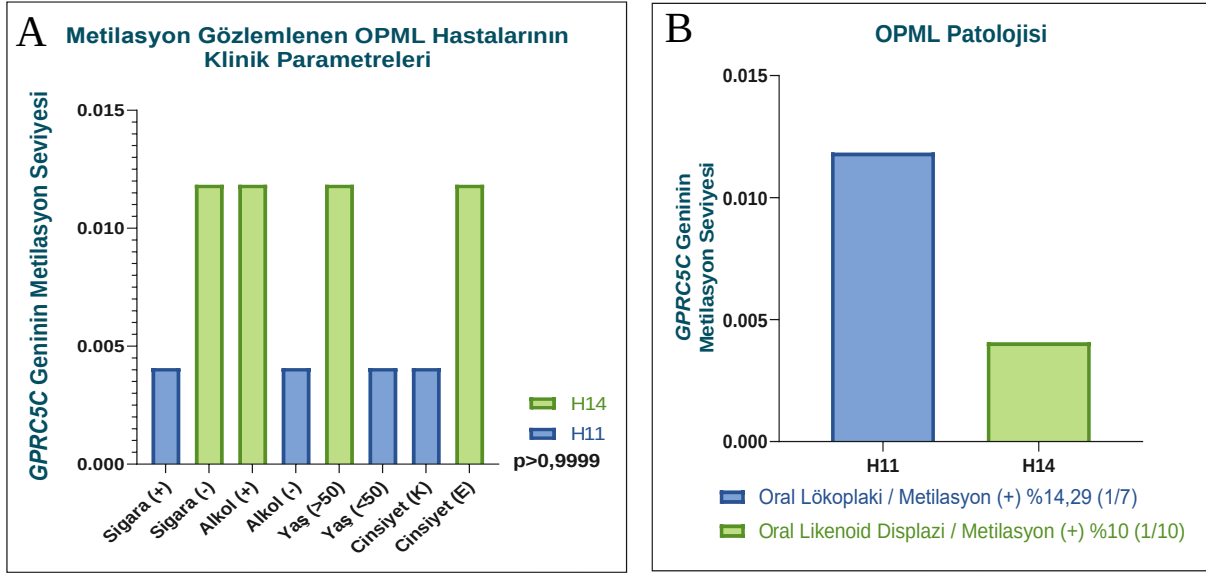
GPRC5C geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen 4 OSCC hastaları sırasıyla; metilasyon seviyesi %3,43 olan P1 hastası sert damak bölgesinde

anatomik tutulu gösteren, Evre IV, sigara kullanan, alkol kullanmayan, lenf nodu tulumu gösteren, differansiyasyon derecesi az, 50 yaştan büyük erkek hastadır. Metilasyon seviyesi 5,20 olan P10 hastası dil bölgesinde anatomik tutulu gösteren, Evre I, sigara kullanan, alkol kullanımı ve lenf nodu tulumu göstermeyen, differansiyasyon derecesi orta olan ≥ 50 yaştan büyük kadın hastadır, metilasyon seviyesi 12,17 olan P3 hastası bukkal mukoza bölgesinde anatomik tutulu gösteren, Evre IV, sigara ve alkol kullanmayan, lenf nodu tulumu gösteren, 50 yaştan büyük kadın hastadır, metilasyon seviyesi 4,788402 olan P4 hastası bukkal mukoza bölgesinde anatomik tutulu gösteren, Evre II, sigara kullanan, alkol kullanmayan ve lenf nodu tulumu göstermeyen, 50 yaş altı erkek hastadır (Şekil 4.3-4).



Şekil 4.3-5: OSCC grubunda metilasyon görülen hastaların klinik parametre ve patoloji bilgisi. (A) *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen OSCC hastalarının klinik parametrelerinin gösterimi. (B) *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen OSCC hastalarının anatomik tutulumlarının gösterimi.

GPRC5C geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen 2 OPML hastaları sırasıyla; metilasyon seviyesi 0,004075 olan P1 hastası oral lökoplaki patolojisi gösteren, sigara kullanan, alkol kullanan, 50 yaş altı kadın hastadır, metilasyon seviyesi 0,011844 olan P2 hastası oral likenoid displazi patolojisi gösteren, sigara kullanmayan, alkol kullanımı olan, 50 yaştan üzeri erkek hastadır (Şekil 4.3-6).



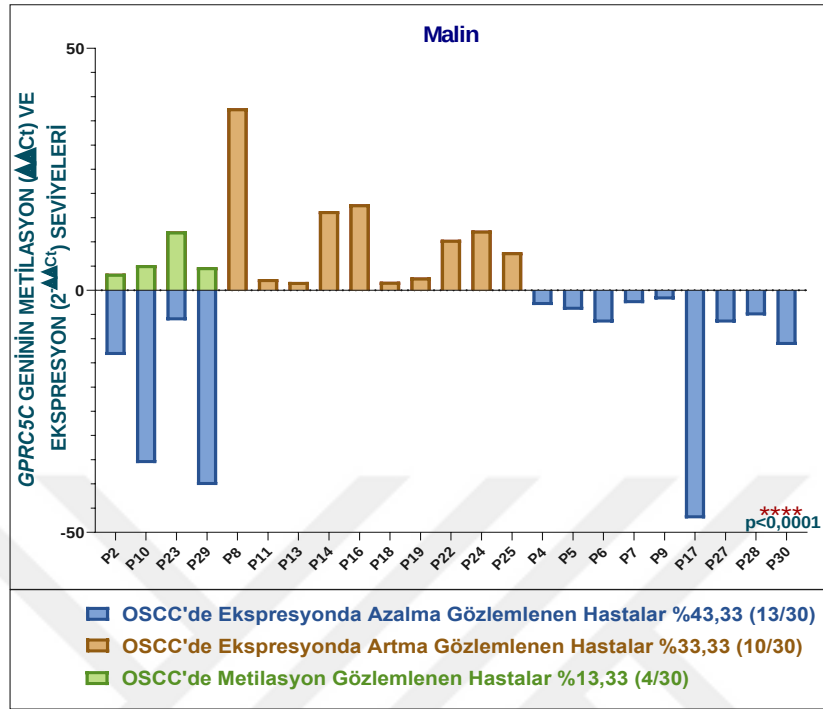
Şekil 4.3-6: OPML grubunda metilasyon görülen hastaların klinik parametre ve patoloji bilgisi. (A) *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen metilasyon gözlemlenen OPML hastalarının klinik parametrelerinin gösterimi. (Yeşil: H14 hasta, Mavi: H11 hasta) (B) *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki CpG adacıklarında metilasyon gözlemlenen metilasyon gözlemlenen OPML hastalarının patolojisinin gösterimi. (Yeşil: Oral likenoid displazi patolojisi gösteren metilasyon pozitif hasta, Mavi: Oral Lökoplaki patolojisi gösteren metilasyon pozitif hasta)

4.4. *GPRC5C* Geninin Metilasyona Bağlı Ekspresyon Seviyesinde Azalma

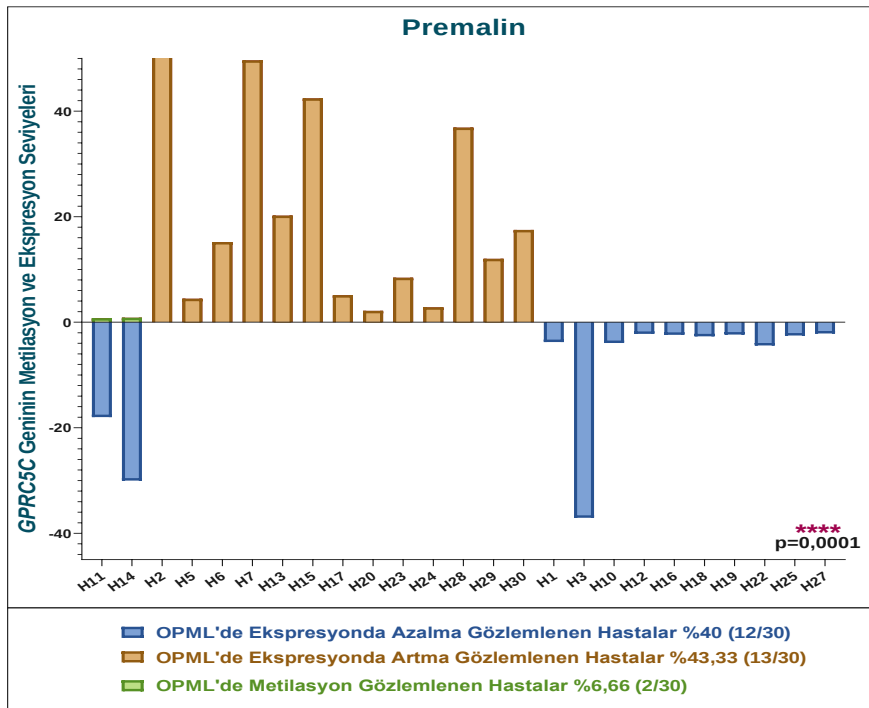
Malin grupta tümör dokusunda *GPRC5C* geninin promoter bölgesinde metilasyon gözlenen 4 hastada tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edildi ($p<0,0001$) (Şekil 4.4-1). Tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastaların eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerin de metilasyon gözlemlenmemiştir. Şekil 4.4-1’de gösterilen OSCC hasta grubunda metilasyon gözlenen hastalar ile ekspresyonda azalma gözlenen hastalar arasında one-way Anova/ Friedman Test analizine göre anlamlılık görülmüştür ($p=0,0036^{**}$), yine aynı analize göre ekspresyonda azalma gözlemlenen hastalar ile ekspresyonda artma gözlemlenen hastalar arasında anlamlılık görülmüştür ($p<0,0001$).

Premalin grupta tümör dokusunda *GPRC5C* geninin promoter bölgesinin CpG adacıklarında metilasyon gözlenen 2 hastada tümör dokusunda eşlenik normal dokusuna göre ekspresyon seviyesinde azalma olduğu tespit edildi (Şekil 4.4-2). Tümör dokusunda metilasyon gözlemlenen bu 2 hastanın eşlenik normal doku, serum ve tükürükte metilasyon gözlemlenmemiştir. Şekil 4.4-2’de gösterilen OPML hasta grubunda yapılan one-way Anova analizine göre; metilasyon gözlenen hastalar ile ekspresyonda azalma gözlenen hastalar

arasında ($p=0,0264^*$), ekspresyonda azalma gözlemlenen hastalar ile ekspresyonda artma gözlemlenen hastalar arasında ($p<0,0001$) anlamlılıklar görülmüştür.



Şekil 4.4-1: OSCC hasta grubunda *GPRC5C* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin one-way Anavo analizi ile gösterimi ($p=0,0010$).

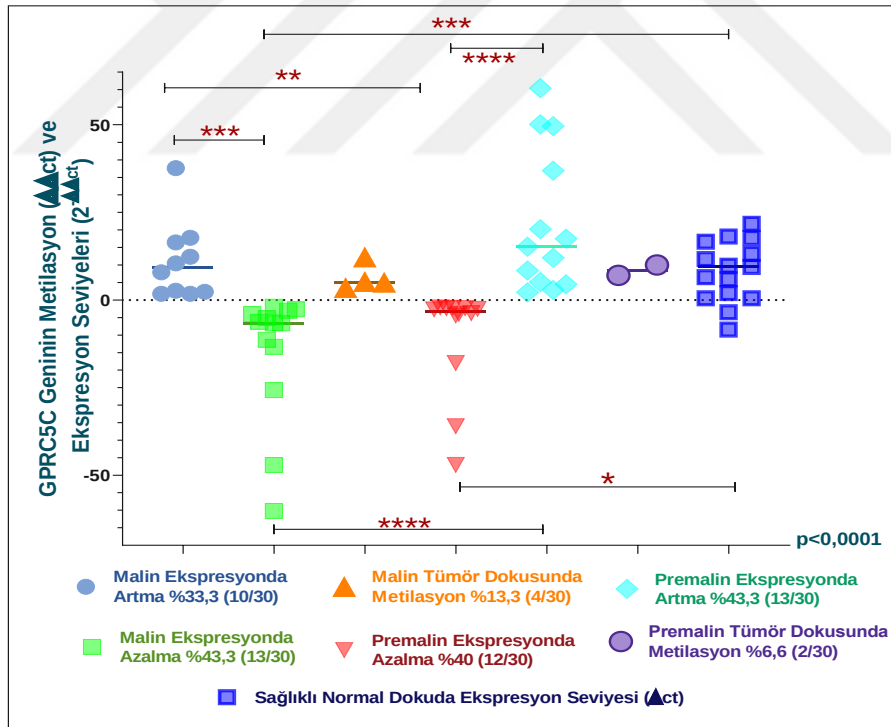


Şekil 4.4-2: OPML hasta grubunda *GPRC5C* geninin ekspresyon ve promotor bölgesindeki metilasyon seviyelerinin Friedman analizi ile gösterimi ($p<0,0001$).

4.5. Ekspresyon ve Metilasyon Sonuçlarının Birlikte Değerlendirilmesi

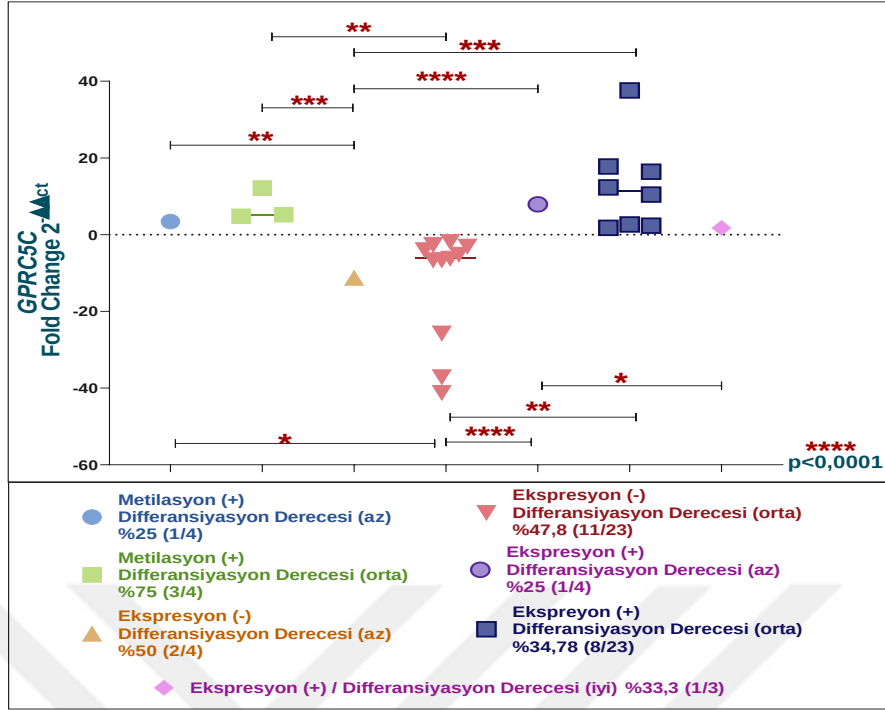
OSCC, OPML ve sağlıklı grupların genel ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin karşılaştırılarak yapılan Anova/ Friedman Test analizine göre “ $<0,0001$ ” olan p değeri ile anlamlılık tespit edilmiştir (Şekil 4.5-1).

Şekil 4.5-1’de gösterilen grafik analizini detaylı incelediğimiz zaman, OSCC hastalarının ekspresyon seviyelerinde artma ve azalma arasında ($p=0,0002^{***}$), OPML hastalarının ekspresyon seviyelerindeki azalma ile OSCC hastalarının ekspresyon seviyesindeki artma arasında ($p=0,0042^{**}$), OPML hastalarının ekspresyon seviyelerindeki artma ile OSCC hastalarının ekspresyon seviyelerindeki azalma arasında ($p<0,0001^{****}$), OSCC hastalarının ekspresyon seviyelerinde azalma ile sağlıklı bireylerin ekspresyon seviyeleri arasında ($p<0,0002^{***}$), OPML hastalarının ekspresyon seviyelerindeki azalma ile sağlıklı bireylerin ekspresyon seviyeleri arasında ($p<0,0050^{**}$), OPML hastalarının ekspresyon seviyelerindeki azalma ve artma arasında ($p<0,0001^{****}$) anlamlılıklar görülmüştür.



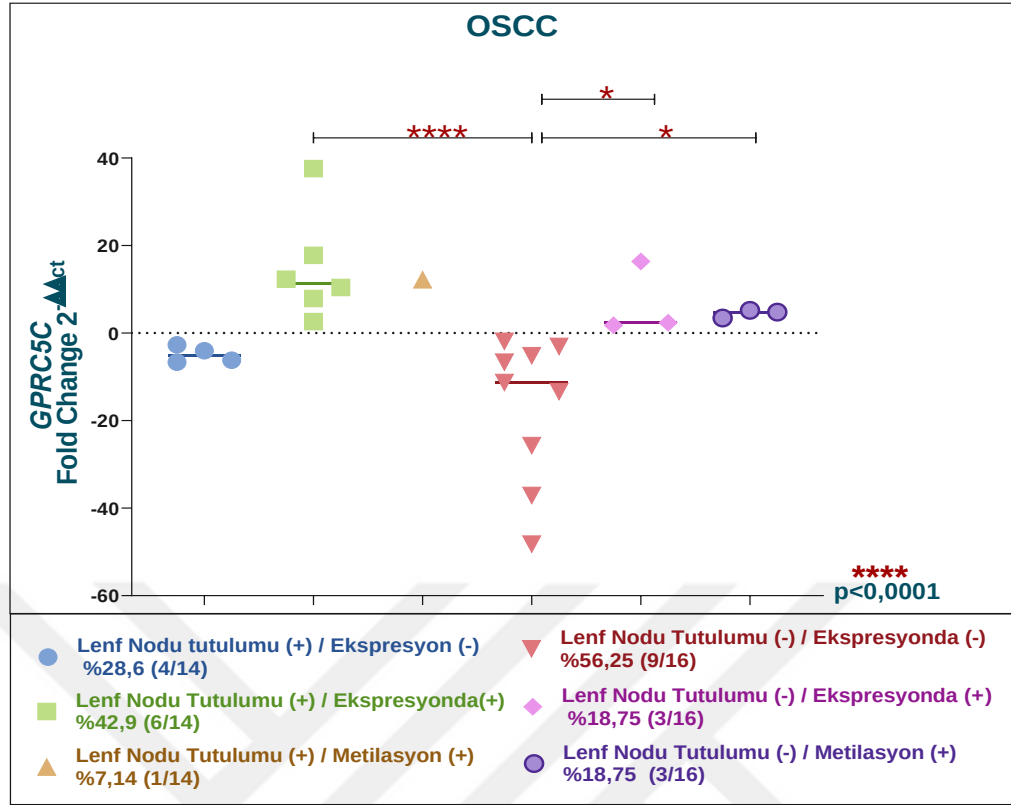
Şekil 4.5-1: OSCC, OPML ve sağlıklı grupların ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin birlikte Anova/ Friedman analizinin gösterimi ($p<0,0001$).

Malin hasta grubunda diferansiyasyon derecesinin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin birlikte karşılaştırılarak Anova/ Friedman analizine yapılmış ve anlamlılık ($p<0,0001^{****}$) bulunmuştur (Şekil 4.5-2).



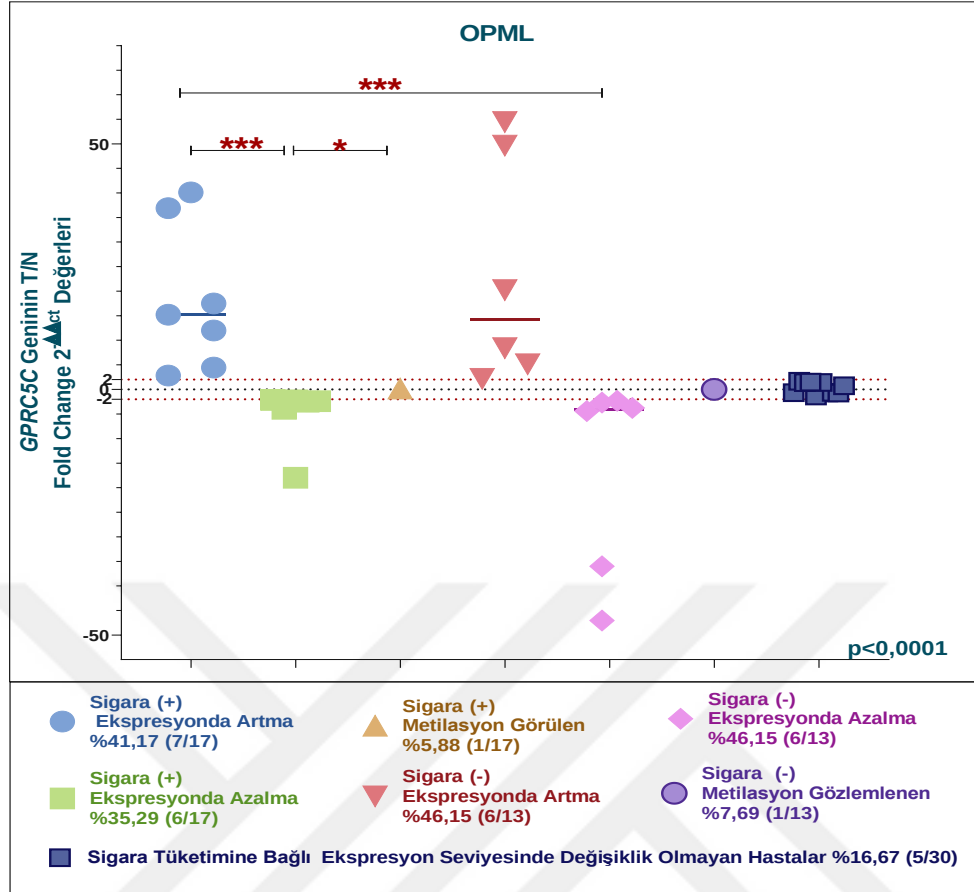
Şekil 4.5-2: OSCC hasta grubunda GPRC5C geninin ekspresyon seviyeleri ve promotor bölgesinde meydana gelen metilasyon seviyeleri ile differansiyasyon derecelerinin Anova/ Friedman analizinin gösterimi ($p<0,0001$).

OSCC hasta grubunda GPRC5C geninin ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin, lenf nodu tutulumu (LNT) gözlemlenen/gözlemlenmeyen hastalardaki One-way Anova analizi Şekil 4.5-3'te gösterilmiş. Buna göre LNT gözlemlenen 14 hastanın 4'ünde (%28,6) ekspresyonda azalma, 6'sında (%42,9) ekspresyonda artma gözlemlenirken 4 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. LNT gözlemlenen 14 hastanın 1'inde (%7,14) metilasyon gözlemlenmiştir. LNT gözlemlenmeyen 16 hastanın 9 unda (%56,25) ekspresyonda azalma, 3'ünde (%18,75) ekspresyonda artma gözlemlenirken 4 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. LNT gözlemlenen 16 hastanın 3'ünde (%18,75) metilasyon gözlemlenmiştir. Yapılan One-way ANOVA/Friedman analizine göre, LNT(+)/Ekspresyon(+) hasta grubu ile LNT(-)/Ekspresyon(-) hasta grubu arasında $p<0,0001^{****}$ değerinde, LNT(-)/Ekspresyon(-) hasta grubu ile LNT(-)/Met(+) hasta grubu arasında $p=0,0158^*$ değerinde, LNT(-)/Ekspresyon(-) hasta grubu ile LNT(-) /Ekspresyon(+) hasta grubu arasında $p=0,0375^*$ değerinde olan anlamlılıklar görülmüştür.



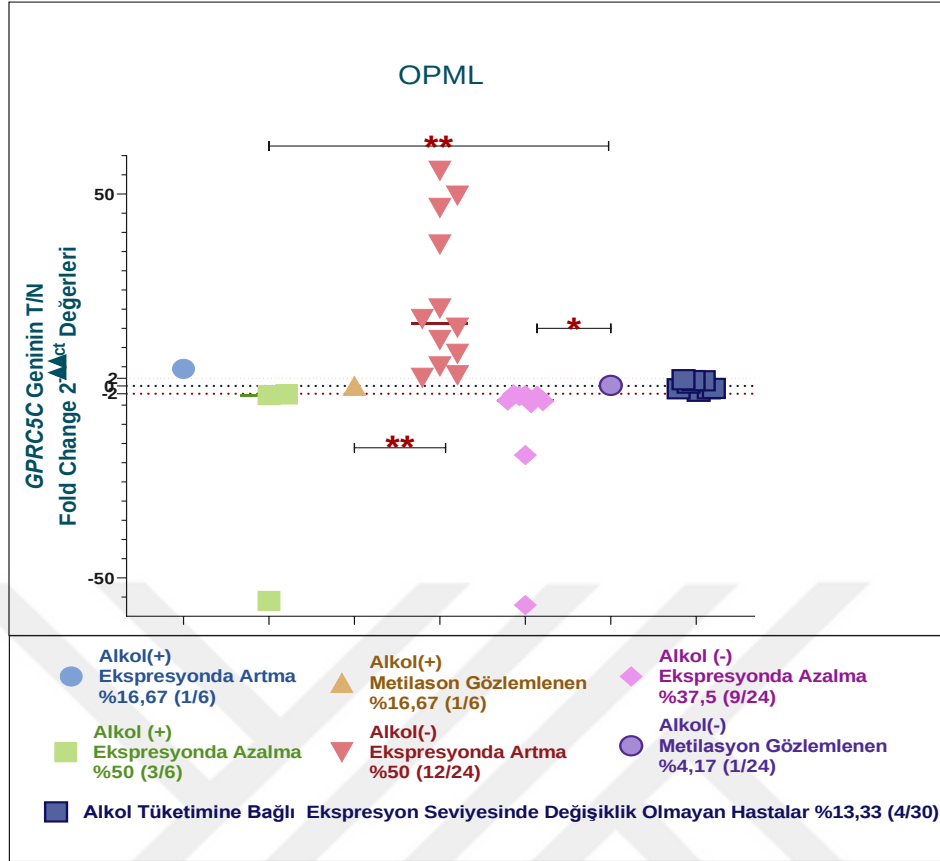
Şekil 4.5-3: OSCC hasta grubunun klinik parametrelerinden lenf nodu tutulumu gözlemlenen ve gözlemlenmeyen hastalardaki *GPRC5C* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA/Friedman Analizi ile gösterimi ($p<0,0001$).

GPRC5C geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri sigara tüketimine bağlı olarak OPML hastalarındaki One-way ANOVA analizi Şekil 4.5-4'te gösterilmiştir. Sigara tüketen 17 hastanın 7'sinde (%41,17) ekspresyonda artma, 6'sında (%35,29) ekspresyonda azalma, 1 hastada (%5,88) metilasyon gözlemlenirken, 4 hastanın ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Sigara tüketimi olmayan 13 hastanın 6'sında (%46,15) ekspresyonda azalma, 6'sında (%46,15) ekspresyonda artma, 1 hastada (%7,69) metilasyon gözlemlenirken, diğer 1 hastanın ekspresyon seviyesinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Yapılan analize göre, sigara tüketen ekspresyonda azalma ile artma görülen hastalar arasında $p=0,0002^{***}$ değerinde, sigara tüketen ekspresyonda azalma görülen hastalar ile sigara tüketen metilasyon görülen hasta arasında $p=0,0194^*$ değerinde, sigara tüketen ekspresyonda artma gözlemlenen hastalar ile sigara tüketim olmayan ekspresyonda azalma gözlemlenen hastalar arasında $p=0,00011^{***}$ değerinde olan anlamlılıklar görülmüştür (Şekil 4.5-4).



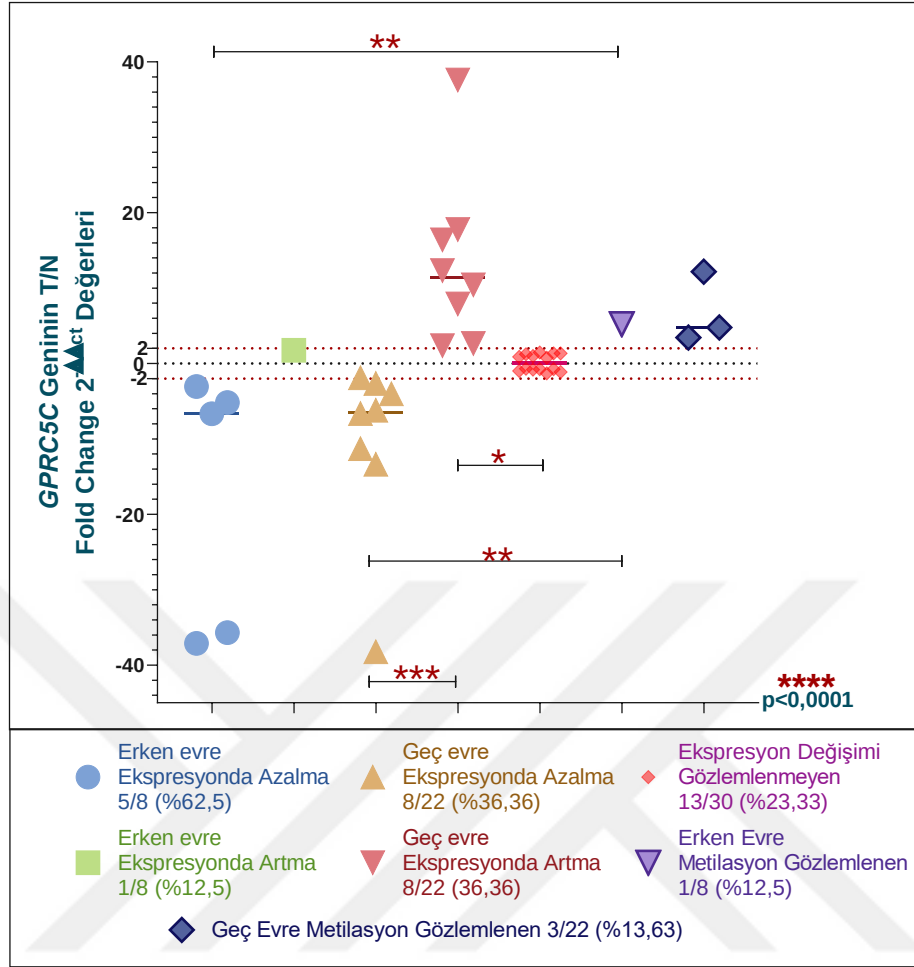
Şekil 4.5-4: OPML hasta grubunun klinik parametrelerinden sigara tüketimine bağlı olarak GPRC5C geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA/Friedman Analizi ile gösterimi (p<0,0001).

GPRC5C geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri ile OPML hastalarındaki alkol tüketimine bağlı olarak One-way Anova analizi Şekil 4.5-5'te gösterilmiştir. Alkol tüketen 6 hastanın 1'inde (%16,67) ekspresyon seviyesinde artma, 3'ünün (%50) ekspresyon seviyesinde azalma, 1'inde (%16,67) metilasyon gözlemlenirken, 2 hastanın ekspresyon seviyesinde değişiklik gözlemlenmemiştir. Alkol tüketimi olamayan 24 hastanın 12'sinin (%50) ekspresyon seviyesinde artma, 9'unun (%37,5) ekspresyon seviyesinde azalma, 1'inde (%4,17) metilasyon gözlemlenmiştir. Yapılan analize göre, alkol tüketen ekspresyonda azalma ile alkol tüketmeyen metilasyon görülen hasta ile aralarında $p=0,0048^{**}$ değerinde, alkol tüketen metilasyon görülen hasta ile alkol tüketmeyen ekspresyonda artma arasında $p=0,0069^{**}$ değerinde, alkol tüketmeyen ekspresyonda azalma ile metilasyon görülen hasta arasında $p=0,0167^{*}$ değerinde anlamlılıklar görülmüştür.



Şeki 4.5-5: OPML hasta grubunun klinik parametrelerinden alkol tüketimine bağlı olarak *GPRC5C* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA/Friedman Analizi ile gösterimi ($p < 0,0001$).

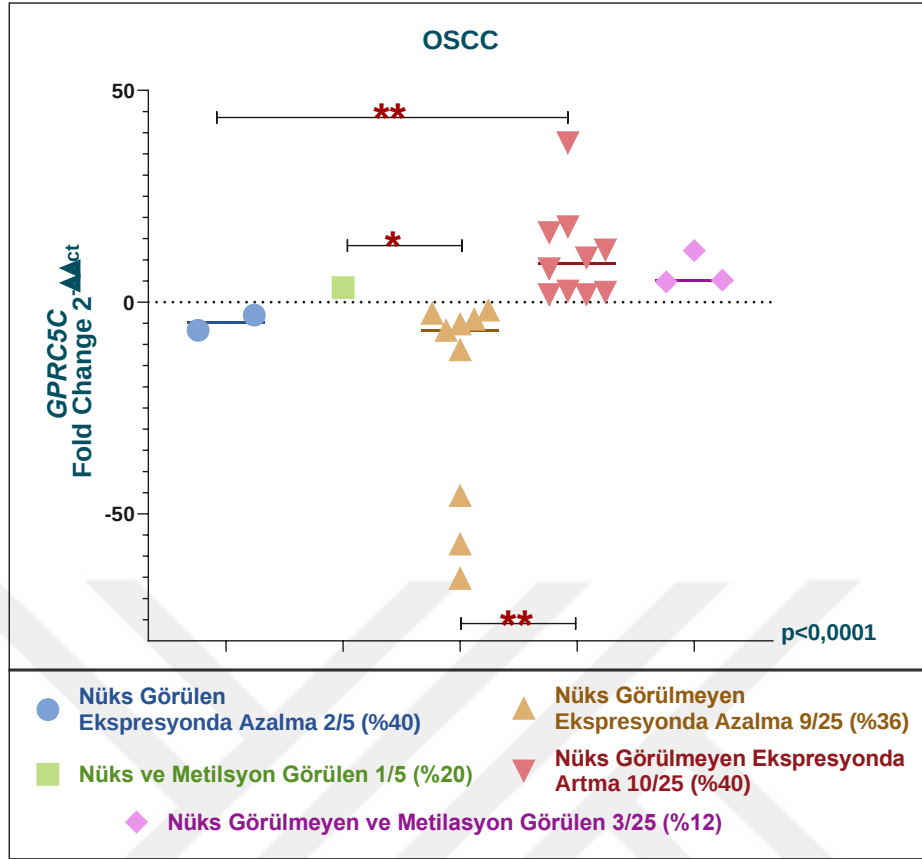
GPRC5C geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri ile OSCC hastalarının erken (TNM I ve II) ve geç evre (TNM II ve IV) derecelerine göre, One-way Anova testi ile analiz edilmiş ve Şekil 4.5-6'da gösterilmiştir. Erken evredeki 8 hastanın 5'inde (%62,5) ekspresyonda azalma, 1'inde (%12,5) ekspresyonda artma, 1'inde (12,5) metilasyon gözlemlenmiştir. Geç evredeki 22 hastanın 8'inde (%36,36) ekspresyonda azalma, 8'inde (%36,36) ekspresyonda artma, 3'ünde (%13,63) metilasyon gözlemlenmiştir. Ekspresyonda artma gözlemlenen geç evre hasta grubu ile ekspresyon değişimi gözlemlenmeyen hasta grubu ile arasında istatistiksel anlamlılık gözlemlendi ($p = 0,0134^*$). Geç evredeki ekspresyonda azalma görülen hasta grubu ile erken evrede metilasyon gözlemlenen hasta arasında $p = 0,0011^{**}$ değerinde anlamlılık gözlemlendi. Geç evredeki ekspresyonda azalma ve artma görülen hasta grupları arasında $p = 0,0001^{***}$ değerinde, Erken evredeki ekspresyonda azalma görülen hasta grubu ve metilasyon gözlemlenen hasta arasında $p = 0,0036^{**}$ değerinde anlamlılıklar görülmüştür.



Şeki 4.5-6: Evreye göre OSCC hasta grubunun ekspresyon ve metilasyon seviyeleri.

OSCC hasta grubunun klinik parametrelerinden geç/erken evreye göre, *GPRC5C* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA/Friedman Analizi ile gösterimi ($p < 0,0001$).

GPRC5C geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri ile OSCC hastalarının nüks durumu incelendiğinde, One-way ANOVA analizi gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.5-6'da gösterilmiştir. Nüks görülen 5 hastanın 2'sinde (%40) ekspresyon seviyesinde azalma, 1'inde (%20) metilasyon gözlemlenmiştir. Nüks görülmeyen 25 hastanın 9'unda (%36) ekspresyonda azalma, 10'unda (%40) ekspresyonda artma, 3'ünde metilasyon gözlemlenmiştir. Yapılan analize göre, nüks ve metilasyon görülen hasta ile metilasyon görülmeyen ekspresyonda azalma görülen hasta grubu arasında ($p = 0,0236^*$), nüks görülen ekspresyonda azalma ile nüks görülmeyen ekspresyonda artma arasında ($p = 0,0069^{**}$), Nüks görülmeyen ekspresyonda artma ve azalma görülen hasta grupları arasında ($p = 0,0010^{**}$) anlamlılıklar görülmüştür.



Şekil 4.5-7: OSCC hasta grubunun klinik parametrelerinden nüks takibine göre, *GPRC5C* geninin ekspresyon ve metilasyon seviyeleri One-way ANOVA/Friedman Analizi ile gösterimi ($p<0,0001$).

OSCC grubunun klinik parametrelere göre %95 güven aralığında yapılan Anova analizine göre p değerleri tablo 4.5-1’de özetlenmiştir.

OPML grubunun klinik parametrelere göre %95 güven aralığında yapılan Anova analizine göre p değerleri tablo 4.5-2’de özetlenmiştir.

Tablo 4.5-1: OSCC Hasta Grubu ile Klinik Parametrelerin One-Way Anova/Friedman Analizine Göre p Değerleri

Klinik Parametreler	Nüks	LNT	Sigara Tüketimi	Alkol Tüketimi	Anatomi	Diff. Derecesi	Evre
p Değeri	<0,0001	<0,0001	0,0004	<0,0001	0,0004	<0,0001	0,0003

Tablo 4.5-2: OPML Hasta Grubu ile Klinik Parametrelerin One-Way Anova/Friedman Analizine Göre p Değerleri

Klinik Parametreler	Sigara Tüketimi	Alkol Tüketimi	Patoloji
p Değeri	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Demokan ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir önceki projemizde, *GPRC5C* geninin array yöntemiyle metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenen OSCC grubunda 9 hasta

bulunmaktadır. Hastaların yaş ortalaması 60'tır. 9 hastanın 5'i (%55,56) erkek hastayken 4'ü (%44,45) kadın hastadır. Evrelere göre; 2 hasta (%22,23) Evre I, 2 hasta (%22,23) Evre II, 3 hasta (%33,34) Evre III ve 2 hasta (%22,23) Evre IV'tür. 9 hastanın 2'sinde (%22,23) LNT görülürken, 7 hastada (%77,78) LNT görülmemektedir. LNT ile aynı oranda nüks görülmüştür. Alkol tüketen 1 hasta (%11,12), sigara kullanan 3 hasta (%33,33) bulunmaktadır. 1 hasta (%11,12) yanak, 1 hasta (%11,12) oral kavite, 1 hasta (%11,12) ağız tabanı bölgesinde tutulum gösterirken, 6 hasta (%66,67) dil bölgesinde tutulum göstermiştir. Array yönteminin sonuçlarına bakıldığında, ekspresyon için; $\log FC=0,59663$ ($p=0,043$), metilasyon için; $\Delta\text{Beta}=-0,130984561$ değerleri bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlılık görülmüştür. OSCC tümör-normal doku karşılaştırmasında *GPRC5C* geninin CpG bölgelerinde tümör grupları metillenmiş, buna bağlı olarak ekspresyon seviyeleri down-regüle olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.5-3/4.5-4'te OPML grubunun ekspresyon seviyeleri ve metilasyon yüzdeleri klinik parametrelere göre özetlenmiştir. Tablo 4.5-5/4.5-6'da OSCC grubunun ekspresyon seviyeleri ve metilasyon yüzdeleri klinik parametrelere göre özetlenmiştir.

Tablo 4.5-3: OPML hasta grubunun (n=30) klinik parametrelere göre ekspresyon ve metilasyon sonuçları

		N (%)	Ekspresyonda Azalma N (%)	Ekspresyonda Artma N (%)	Ekspresyon Seviyesinde D. G.
Cinsiyet	Kadın	15 (50)	5 (33,33)	7 (46,67)	3 (20)
	Erkek	15 (50)	7 (46,67)	6 (40)	2 (13,33)
Yaş	≤50	17 (56,67)	6 (40)	6 (40)	3 (20)
	>50	13 (43,3)	6 (40)	7 (46,67)	2 (13,33)
Patoloji	OL	10 (33,33)	5 (50)	4 (40)	1 (10)
	OLD	7 (23,3)	5 (71,43)	0	2 (28,57)
	LP	13 (43,33)	2 (15,38)	9 (69,23)	2 (15,38)
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13 (43,33)	6 (46,15)	6 (46,15)	1 (7,69)
	Var (+)	17 (56,67)	6 (15,29)	7 (41,17)	4 (23,52)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	24 (80)	9 (37,5)	12 (50)	3 (12,5)
	Var (+)	6 (20)	3 (50)	1 (16,67)	2 (33,33)

Tablo 4.5-4: OPML hasta grubunun klinik parametrelere göre metilasyon sonuçları

		N (%)	Metilasyon N (%)	Metilasyona Bağlı Ekspresyon Değişimi
Cinsiyet	Kadın	15 (50)	1 (6,67)	1 (50)
	Erkek	15 (50)	1 (6,67)	1 (50)
Yaş	≤50	17 (56,67)	1 (6,67)	1 (50)
	>50	13 (43,3)	1 (6,67)	1 (50)
Patoloji	OL	10 (33,33)	1 (10)	1 (50)
	OLD	7 (23,3)	1 (14,28)	1 (50)
	LP	13 (43,33)	0	0
Sigara Tüketimi	Yok (-)	13 (43,33)	1 (7,69)	1 (50)
	Var (+)	17 (56,67)	1 (5,88)	1 (50)
Alkol Tüketimi	Yok (-)	24 (80)	1 (4,17)	1 (50)
	Var (+)	6 (20)	1 (16,67)	1 (50)

Tablo 4.5-5: OSCC hasta grubunun klinik parametrelere göre metilasyon sonuçları.

		n (%)	Metilasyon n (%)	Metilasyona Bağlı E. D. n (%)
Cinsiyet	Kadın	8 (26,67)	4 (50)	4 (100)
	Erkek	22 (73,33)	0	0
Yaş	≤50	8 (30)	0	0
	>50	22 (70)	4 (18,18)	4 (100)
Anatomik Tutulum	Dil	10 (33,33)	2 (20)	2 (50)
	Bukkal M.	6 (20)	0	0
	Inferior Al. Ark.	3 (10)	0	0
	Ağız Tabanı	5 (16,67)	0	0
	Retromolar T.	4 (13,33)	1 (25)	1 (25)
	Sert Damak	2 (6,67)	1 (50)	1 (25)
Sigara Tüketimi	Yok	10 (33,33)	1 (10)	1 (25)
	Var	20 (60)	3 (15)	3 (75)
Alkol Tüketimi	Yok	22 (73,33)	4 (18,18)	4 (100)
	Var	8 (26,67)	0	0
Evre	I	2 (6,6)	1 (50)	1 (25)
	II	6 (20)	0	0
	III	5 (16,67)	1 (20)	1 (25)
	IV	17 (56,67)	2 (11,76)	2 (50)
Differasyon Derecesi	Düşük	4 (13,3)	1 (25)	1 (25)
	Orta	23 (76,67)	3/23	3 (75)
	Yüksek	3 (10)	0	0
Lenf Nodu Tutulumu	Yok	16 (53,3)	2 (33,33)	2 (50)
	Var	14 (46,67)	2 (14,28)	2 (50)
Nüks	Yok	25 (83,3)	3 (12)	3 (75)
	Var	5 (16,67)	1 (20)	1 (25)

Tablo 4.5-6: OSCC hasta grubunun klinik parametrelere göre ekspresyon sonuçları.

		n (%)	Ekspresyon Azalma n (%)	Ekspresyon Artma n (%)	Ekspresyon Seviyesinde D. G. n (%)
Cinsiyet	Kadın	8 (26,67)	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25)
	Erkek	22 (73,33)	10 (45,45)	7 (31,81)	5 (22,72)
Yaş	≤50	8 (30)	5 (62,5)	2 (25)	1 (12,5)
	>50	22 (70)	8 (36,36)	8 (36,36)	6 (27,27)
Anatomik Tutulum	Dil	10 (33,33)	5 (50)	4 (40)	1 (10)
	Bukkal M.	6 (20)	1 (16,67)	2 (33,33)	3 (50)
	Inferior Al. Ark.	3 (10)	1 (33,33)	2 (66,67)	0
	Ağız Tabanı	5 (16,67)	3 (60)	1 (20)	1 (20)
	Retromolar T.	4 (13,33)	2 (50)	1 (25)	1 (25)
	Sert Damak	2 (6,67)	1 (50)	0	1 (50)
Sigara Tüketimi	Yok	10 (33,33)	4 (40)	5 (50)	1 (10)
	Var	20 (60)	9 (45)	5 (25)	6 (30)
Alkol Tüketimi	Yok	22 (73,33)	11 (50)	7 (31,81)	4 (18,18)
	Var	8 (26,67)	2 (25)	3 (37,5)	3 (37,5)
Evre	I	2 (6,6)	1 (50)	1 (50)	0
	II	6 (20)	4 (66,67)	1 (16,67)	1 (16,67)
	III	5 (16,67)	2 (40)	3 (60)	0
	IV	17 (56,67)	6 (35,29)	5 (29,41)	6 (35,29)
Differasyon Derecesi	Düşük	4 (13,3)	2 (50)	1 (25)	1 (25)
	Orta	23 (76,67)	11 (47,82)	8 (34,78)	4 (17,39)
	Yüksek	3 (10)	0	1 (33,33)	2 (66,67)
Lenf Nodu Tutulumu	Yok	16 (53,3)	9 (56,25)	4 (25)	3 (18,75)
	Var	14 (46,67)	4 (28,5)	6 (42,85)	4 (28,57)
Nüks	Yok	25 (83,3)	10 (40)	10 (40)	5 (20)
	Var	5 (16,67)	3 (60)	0	2 (40)

5. TARTIŞMA

Oral kavite kanserleri, tüm baş boyun kanserlerinin %30'unu oluşturmaktadır. Verilere göre ortalama tanı konma yaşı 64 olup hastaların çoğunluğu erkeklerden oluşmaktadır. OSCC, en sık görülen histopatolojidir. Etiyolojide en önemli etkenler tütün kullanımı ve alkoldür (Baden 2008). Karsinogenez de çevresel etkenlerin yanı sıra genetik/epigenetik faktörlerde rol oynar. Epigenetik, DNA dizisinde değişikliğe yol açmadan genin ifadesini değiştiren ve kalıtılabilen özellikleri inceler (Esteller & Manel, 2008). Epigenetik mekanizmalar; histon modifikasyonları, DNA metilasyonu, miRNA regülasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesi olarak belirtilmiştir (Shinjo and Kondo 2015).

Prof.Dr. Semra Demokan ve ark. yapmış olduğu TÜBİTAK-SBAG-114S497 nolu TÜBİTAK projesinde OSCC ve OPML hastalarına ait tümör/eşlenik normal dokularındaki ekspresyon ve metilasyon array verilerine (Ekspresyon;logFC:0,59663 p-value: 0,042959 Metilasyon;DeltaBeta: -0,130984561) göre *GPRC5C* geninin CpG adacıklarının metillenmiş olduğu ve buna bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, *GPRC5C* geninin promoter bölgesindeki metilasyon ve ekspresyon durumu ile metilasyona bağımlı ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişiklikler incelenip sağlıklı popülasyon ile karşılaştırıldı.

Çalışmamızda OSCC ve OPML hastalarında tümör, eşlenik normal doku, serum ve tükürükte DNA/RNA izolasyonu yapılarak *GPRC5C* geni metilasyon ve ekspresyon oranları incelenip, metilasyona bağlı ekspresyon oranlarındaki azalma araştırıldı. Metilasyonu göstermek için QMSP yöntemi kullanılmış olup ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde QRT-PCR yöntemi uygulandı.

Demokan ve ark. yaptığı önceki projemizdeki array yönteminin sonuçlarına göre, OSCC grubunda istatistiksel anlamlılık bulunan *GPRC5C* genine ait promoter metilasyonu ve ekspresyon seviyesindeki farklılıklar OSCC ve OPML hastalarının tümör ve eşlenik normal dokuları ile vücut sıvı örneklerinde incelendi. OSCC hastalarına ait eşlenik-normal dokularına kıyasla tümör dokularında ekspresyon seviyelerinde artma ve azalma arasında $p=0,0016$ değerinde istatistiksel anlamlılık gözlemlendi. OSCC grubunda 4 hastanın tümör dokularında düşük seviyede metilasyon gözlemlenmedi. OSCC hastalarına ait eşlenik normal doku, serum ve tükürük örneklerinde metilasyon gözlemlenmedi. OSCC hastalarının tümör dokularında sağlıklı mukozaya göre -0,11466 kat ekspresyon seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir.

Ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin klinik parametreler (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, farklılaşma derecesi, LNT, evre, anatomik tutulum bölgesi) ile yapıldığı istatistiksel analizlere (ANOVA) göre, ekspresyon seviyeleri ile differansiyasyon derecesi ($p < 0.0001$), evrelere ($p=0,0003$), LNT ($p < 0.0001$) ve anatomisi ($p=0,0004$) arasında istatistiksel olarak anlamlılıklar bulundu. OPML hastalarına ait eşlenik-normal dokularına kıyasla tümör dokularında ekspresyon seviyelerinde artma ve azalma arasında istatistiksel anlamlılık ($p=0,0005$) gözlemlendi. OPML grubunda 2 hastanın tümör dokularında metilasyon gözlemlendi. OPML tümörlerinde sağlıklı mukozaya göre -0,06462 kat ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmiştir. Ekspresyon ve metilasyon seviyelerinin klinik parametreler (yaş, cinsiyet, sigara/alkol kullanımı, patoloji) ile yapıldığı istatistiksel analizlere (Anova) göre, Patolojisi ile ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlık bulundu ($p<0,0001$).

Literatürde *GPRC5C* geninin oral kavite kanserleri ile ilgili yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. *GPRC5C* geninin ekspresyon durumlarının incelendiği meme kanseri ve nöroblastoma hücre soylarında yapılan 2 çalışma mevcuttur (Ross, R.A. 2015; Yamaga et al. 2014). Çalışmamız, *GPRC5C* geninin oral kavite kanserlerinde çalışılan ilk çalışmadır ve literatüre katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Ross ve ark. yaptığı çalışmada, 3 farklı tip (I-N-S) hücreler kullanılmıştır. In vitro, I-tip (orta tip) olarak adlandırılan habis nöroblastoma kök hücreleri, farklı morfolojik, biyokimyasal, farklılaştırıcı ve tümörjenik özelliklere sahip olduğunu, I-tipi hücrelerin, hem nöroblastik (N) hücrelerin (yetersiz sitoplazma, nöritik süreçler, nörofilamentler, psödoganglia ve granin ve nörotransmitter enzim ekspresyonu) ve substrata bağlı (S) hücrelerin (geniş sitoplazma ve vimentin ve CD44 ekspresyonu) özelliklerini ifade ettiğini belirtmişlerdir. N ve S tipi hücreler arasında bir morfoloji ara maddesi nedeniyle I benzeri olarak adlandırılan üçüncü bir hücre tipinin, kök hücre benzeri bir hücre olduğu gösterilmiştir (Walton et al. 2004). I tipi hücreler, hem N hem de S fenotiplerinin marker proteinlerine sahiptir ve N-tipi hücrelerden 4-5 kat daha fazla tümörjeniktir. QRT-PCR yöntemiyle *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyesi, N ve S hücrelerine kıyasla I-tipi hücrelerde önemli ölçüde (15 kat) daha yüksek olduğu görülmüştür (Ross, R.A. 2015). Bizim çalışmamız ile benzer yöntem kullanılarak *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir, ayrıca nöroblastik hücrelerde olduğu gibi OSCC ve OPML hasta gruplarının tümör ve eşlenik normal dokularında da *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyesinde azalma ve artış oranlarının yaklaşık olarak aynı olduğu görülmüştür.

Yamaga et al., (2014) çalışmasında, MCF-7 hücrelerinde östrojen tarafından düzenlenen genlerin fonksiyonel analizine bakılmış ve deneylerinde, ERα (ESR1) ve p53 genlerini hedefleyen siRNA'lar kullanılmıştır. SiRNA'ların MCF-7 hücrelerinin büyümesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için yapılan MTS tahlilinde, voltaja bağımlı anyon kanalı 2'yi (VDAC2) hedefleyen siRNA'lar hücre büyümesini önemli ölçüde azaltırken, *GPRC5C*'yi hedefleyen siRNA büyüme desteklediği görülmüş. Bu sonuçlar, ISOC1 ve VDAC2'nin, *GPRC5C*'nin MCF-7 hücrelerinin büyümesini inhibe ederken, uyardığını göstermekte olduğunu söylemişlerdir. *GPRC5C* geninin susturulması göçü etkilemediğini, ancak MCF-7 hücrelerinin büyümesini engellediği görülmüş. Kromozom 17 üzerinde bulunan insan *GPRC5C*'sinin, CAGE ve QRT-PCR yöntemleri kullanılarak östrojene yanıt olarak kademeli olarak down-regüle edildiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, *GPRC5C* geninin ekspresyon seviyesinin östrojen tarafından negatif olarak düzenlendiği ve meme kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyebileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda, OSCC ve OPML grubunda ROC analizi sonucuna göre özellikle tümör dokusunun eşlenik normal doku ve sağlıklı mukozadaya göre yüksek özgüllük ve duyarlılık değerleri de mukozanın normal düzeninin dışında meydana gelen ekspresyon seviyesindeki değişimler olası malinite ihtimaline karşı takip edilmesi gerekebilecek lezyonlar ile ilgili geliştirilecek yeni tanı yöntemlerinde *GPRC5C* geninin önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. OSCC prognozunda geç evredeki (evreIII-evreIV) ekspresyon azalışının erken evreye (evreI-evreII) göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre *GPRC5C* ekspresyon seviyesindeki farklılık prognostik belirteçler olarak kullanılabileceği söylenebilir.

OSCC ve OPML hasta gruplarında ekspresyon seviyesindeki değişiklikler ile klinik parametreler (differansiyasyon derecesi, LNT, evre, anatomisi, patolojisi) arasında istatistiksel anlamlılıklar görülmesine rağmen, düşük oranlarda gözlemlenen metilasyonun, farklılaşan ekspresyon seviyeleri üzerinde bir etkisinin olmadığını düşünmekteyiz. OSCC ve OPML hasta grubundaki meydana gelen ekspresyon seviyesindeki azalma, oral kavite karsinogenezinde meydana gelen mutasyon kaynaklı olabilir. Hastalıkla ilişkili rolünü anlamak adına daha geniş bir popülasyonda ileri validasyon çalışmaları yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Aghbari, S. M. H., Abushouk, A. I., Attia, A., Elmaraezy, A., Menshawy, A., Ahmed, M. S., and Ahmed, E. M. (2017). Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a meta-analysis of 20095 patient data. *Oral oncology*, 68, 92-102.
- Al-Hassiny, A., Friedlander, L. T., Parachuru, V. P. B., Seo, B., Hussaini, H. M., and Rich, A. M. (2018). Upregulation of angiogenesis in oral lichen planus. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(2), 173-178.
- Almangush, A., Coletta, R. D., Bello, I. O., Bitu, C., Keski-Säntti, H., Mäkinen, L. K., and Tømmola, S. (2015). A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 44(2), 143-150.
- Almangush, A., Salo, T., Hagström, J., and Leivo, I. (2014). Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma—a systematic review. *Histopathology*, 65(5), 587-594.
- Anneroth, G., Batsakis, J., and Luna, M. (1987). Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *European Journal of Oral Sciences*, 95(3), 229-249.
- Arakeri, G., and Brennan, P. A. (2013). Oral submucous fibrosis: an overview of the aetiology, pathogenesis, classification, and principles of management. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 51(7), 587-593.
- Arakeri, G., Rai, K. K., Hunasgi, S., Merks, M. A. W., Gao, S., and Brennan, P. A. (2017). Oral submucous fibrosis: an update on current theories of pathogenesis. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46(6), 406-412.
- Ardekani, A. M., and Naeini, M. M. (2010). The role of microRNAs in human diseases. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2(4), 161.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D., and Ferris, R. L. (2008). Head and neck cancer. *The Lancet*, 371(9625), 1695-1709.
- Attwood, T. K., and Findlay, J. B. C. (1994). Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(2), 195-203.
- Au, J., Patel, D., and Campbell, J. H. (2013). Oral lichen planus. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*, 25(1), 93.
- Audia, J. E., and Campbell, R. M. (2016). Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(4), a019521.

- Awan, Kamran Habib, and Shankargouda Patil. 2016. "Association of Smokeless Tobacco with Oral Cancer - Evidence from the South Asian Studies: A Systematic Review." *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan* 26(9): 775–80.
- Baden, E. (1987). Prevention of cancer of the oral cavity and pharynx. *CA: a cancer journal for clinicians*, 37(1), 49-62.
- Bagan, J. V., Jimenez, Y., Murillo, J., Gavaldá, C., Poveda, R., Scully, C., and Pérez-Alonso, M. (2007). Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 65(1), 46-49.
- Bagan, J., Scully, C., Jimenez, Y., and Martorell, M. (2010). Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral diseases*, 16(4), 328-332.
- Bandyopadhyay, A., Behura, S. S., Nishat, R., Dash, K. C., Bhuyan, L., and Ramachandra, S. (2017). Clinicopathological profile and malignant transformation in oral lichen planus: a retrospective study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 7(3), 116.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Beckhardt, R. N., Weber, R. S., Zane, R., Wolf, P., Garden, A. S., Carrillo, R., and Luna, M. A. (1995). Minor salivary gland tumors of the palate: clinical and pathologic correlates of outcome. *The Laryngoscope*, 105(11), 1155-1160.
- Bjarnadóttir, T. K., Fredriksson, R., and Schiöth, H. B. (2005). The gene repertoire and the common evolutionary history of glutamate, pheromone (V2R), taste (1) and other related G protein-coupled receptors. *Gene*, 362, 70-84.
- Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., and Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263-273.
- Bosetti, C., Gallus, S., Peto, R., Negri, E., Talamini, R., Tavani, A., and La Vecchia, C. (2008). Tobacco smoking, smoking cessation, and cumulative risk of upper aerodigestive tract cancers. *American journal of epidemiology*, 167(4), 468-473.
- Bota, J. P., Lyons, A. B., and Carroll, B. T. (2017). Squamous cell carcinoma of the lip—a review of squamous cell carcinogenesis of the mucosal and cutaneous junction. *Dermatologic Surgery*, 43(4), 494-506.
- Boy, S. C. (2012). Leukoplakia and erythroplakia of the oral mucosa-a brief overview: clinical review. *South African Dental Journal*, 67(10), 558-560.

- Boyd, A. S., and Neldner, K. H. (1991). Lichen planus. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(4), 593-619.
- Brandwein-Gensler, M., Smith, R. V., Wang, B., Penner, C., Theilken, A., Broughel, D., ... and Hebert, T. (2010). Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 34(5), 676-688.
- Brandwein-Gensler, M., Teixeira, M. S., Lewis, C. M., Lee, B., Rolnitzky, L., Hille, J. J., ... and Wang, B. Y. (2005). Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *The American journal of surgical pathology*, 29(2), 167-178.
- Bräuner-Osborne, H., Jensen, A. A., Sheppard, P. O., Brodin, B., Krogsgaard-Larsen, P., and O'Hara, P. (2001). Cloning and characterization of a human orphan family C G-protein coupled receptor GPRC5D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1518(3), 237-248.
- Brauner-Osborne, H., Wellendorph, P., & Jensen, A. A. (2007). Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors. *Current drug targets*, 8(1), 169-184.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
- Bryne, M., Koppang, H. S., Lilleng, R., and Kjærheim, Å. (1992). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*, 166(4), 375-381.
- Busch, C. J., Tribius, S., Schafhausen, P., and Knecht, R. (2015). The current role of systemic chemotherapy in the primary treatment of head and neck cancer. *Cancer treatment reviews*, 41(3), 217-221.
- Campisi, G., Panzarella, V., Giuliani, M., Lajolo, C., Di Fede, O., Falaschini, S., ... and Lo Muzio, L. (2007). Human papillomavirus: Its identikit and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions. *International journal of oncology*, 30(4), 813-823.

- Capella, D. L., Gonçalves, J. M., Abrantes, A. A. A., Grando, L. J., and Daniel, F. I. (2017). Proliferative verrucous leukoplakia: diagnosis, management and current advances. *Brazilian Journal of otorhinolaryngology*, 83(5), 585-593.
- Caponigro, F., Longo, F., Perri, F., and Ionna, F. (2009). Docetaxel in the management of head and neck cancer. *Anti-cancer drugs*, 20(8), 639-645.
- Carvalho, A. L., Jeronimo, C., Kim, M. M., Henrique, R., Zhang, Z., Hoque, M. O., ... and Claybourne, Q. (2008). Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 14(1), 97-107.
- Chakraborty, S., Geetha, M., Sujith, K. M., Biji, M. S., and Sateeshan, B. (2014). Palliative low dose fortnightly methotrexate in oral cancers: Experience at a rural cancer centre from India. *South Asian journal of cancer*, 3(3), 166.
- Cheng, Q., Yi, B., Wang, A., and Jiang, X. (2013). Exploring and exploiting the fundamental role of microRNAs in tumor pathogenesis. *OncoTargets and therapy*, 6, 1675.
- Cheng, Y. S. L., Gould, A., Kurago, Z., Fantasia, J., and Muller, S. (2016). Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 122(3), 332-354.
- Cheng, Y., and Lotan, R. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), 35008-35015.
- Chi, A. C., Day, T. A., and Neville, B. W. (2015). Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(5), 401-421.
- Chuang, J. C., and Jones, P. A. (2007). Epigenetics and microRNAs. *Pediatric research*, 61(7), 24-29.
- Close, L. G., Burns, D. K., Merkel, M., and Schaefer, S. D. (1986). Computed tomography in the assessment of mandibular invasion by intraoral carcinoma. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 95(4), 383-388.
- Criscione, V. D., Weinstock, M. A., Naylor, M. F., Luque, C., Eide, M. J., Bingham, S. F., and Department of Veteran Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial Group. (2009). Actinic keratoses: natural history and risk of malignant transformation in the Veterans Affairs Topical Tretinoin Chemoprevention Trial. *Cancer*, 115(11), 2523-2530.

- Crissman, J. D., Liu, W. Y., Gluckman, J. L., and Cummings, G. (1984). Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer*, 54(12), 2995-3001.
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews genetics*, 10(10), 704-714.
- Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27.
- De Rossi, S. S., & Ciarrocca, K. (2014). Oral lichen planus and lichenoid mucositis. *Dental Clinics*, 58(2), 299-313.
- 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 & Neck Surgery*, 130(1), 83-86.
- Delpu, Y., Cordelier, P., Cho, W. C., and Torrisani, J. (2013). DNA methylation and cancer diagnosis. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 15029-15058.
- Demokan, S., Chuang, A. Y., Chang, X., Khan, T., Smith, I. M., Pattani, K. M., and Westra, W. H. (2013). Identification of guanine nucleotide-binding protein γ -7 as an epigenetically silenced gene in head and neck cancer by gene expression profiling. *International journal of oncology*, 42(4), 1427-1436.
- Diaz Jr, E. M., Holsinger, F. C., Zuniga, E. R., Roberts, D. B., and Sorensen, D. M. (2003). Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: one institution's experience with 119 previously untreated patients. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 25(4), 267-273.
- Dillon, N. (2006). Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus. *Chromosome Research*, 14(1), 117-126.
- Dissanayaka, W. L., Pitiyage, G., Kumarasiri, P. V. R., Liyanage, R. L. P. R., Dias, K. D., and Tilakaratne, W. M. (2012). Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 113(4), 518-525.
- Easwaran, H., Tsai, H. C., and Baylin, S. B. (2014). Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Molecular cell*, 54(5), 716-727.

- Eder-Czembirek, C., Rechinger, S., Kornek, G., Selzer, E., and Seemann, R. (2018). Experience in intra-arterial chemotherapy using two protocols for the treatment of OSCC over two decades at the University Hospital Vienna. *Clinics*, 73.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-463.
- Eicher, S. A., Overholt, S. M., El-Naggar, A. K., Byers, R. M., and Weber, R. S. (1996). Lower gingival carcinoma: clinical and pathologic determinants of regional metastases. *Archives of Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 122(6), 634-638.
- Eisen, D., Carrozzo, M., Bagan Sebastian, J. V., and Thongprasom, K. (2005). Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral diseases*, 11(6), 338-349.
- Ekanayaka, R. P., & Tilakaratne, W. M. (2016). Oral submucous fibrosis: review on mechanisms of malignant transformation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 122(2), 192-199.
- El-Naggar, A. K., Chan, J. K., Grandis, J. R., Takata, T., and Slootweg, P. J. (Eds.). (2017). WHO classification of head and neck tumours. International Agency for Research on Cancer.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-1159.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry*, 79, 351-379.
- Farhi, D., and Dupin, N. (2010). Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clinics in dermatology*, 28(1), 100-108.
- Feller, L. L., Khammissa, R. R., Kramer, B. B., and Lemmer, J. J. (2013). Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer cell international*, 13(1), 31.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology*, 15(2), 172-183.
- Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J. P., Davenport, A. P., ... and Harmar, A. J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews*, 57(2), 279-288.
- Freeman, Karoline et al. 2015. “Fluorouracil Plasma Monitoring: Systematic Review and Economic Evaluation of the My5-FU Assay for Guiding Dose Adjustment in Patients

- Receiving Fluorouracil Chemotherapy by Continuous Infusion.” *Health Technology Assessment*.
- Fu, T. Y., Tsai, M. H., Wang, J. S., and Ger, L. P. (2017). Antioxidant enzymes in oral verrucous carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46(1), 46-49.
- Funk, G. F., Karnell, L. H., Robinson, R. A., Zhen, W. K., Trask, D. K., and Hoffman, H. T. (2002). Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a National Cancer Data Base report. *Head & neck*, 24(2), 165-180.
- Ganesh, D., Sreenivasan, P., Öhman, J., Wallström, M., Braz-Silva, P. H., Giglio, D., ... and Hasseus, B. (2018). Potentially malignant oral disorders and cancer transformation. *Anticancer research*, 38(6), 3223-3229.
- Garzino-Demo, P., Dell’Acqua, A., Dalmasso, P., Fasolis, M., Maggiore, G. M. L. T., Ramieri, G., and Schena, M. (2006). Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 34(6), 344-350.
- Gasche, J. A., and Goel, A. (2012). Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncology*, 8(11), 1407-1425.
- Gharat, S. A., Momin, M., and Bhavsar, C. (2016). Oral squamous cell carcinoma: current treatment strategies and nanotechnology-based approaches for prevention and therapy. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(4).
- Goldenberg, D., and Koch, W. M. (2009). Surgical Treatment of Early Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. In *Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Head and Neck Cancers* (pp. 115-127). Elsevier Inc..
- Gorenchtein, M., Poh, C. F., Saini, R., and Garnis, C. (2012). MicroRNAs in an oral cancer context—from basic biology to clinical utility. *Journal of dental research*, 91(5), 440-446.
- Greer Jr, R. O., Eversole, L. R., and Crosby, L. K. (1990). Detection of human papillomavirus-genomic DNA in oral epithelial dysplasias, oral smokeless tobacco-associated leukoplakias, and epithelial malignancies. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 48(11), 1201-1205.
- Gueiros, L. A., Coletta, R. D., Kowalski, L. P., and Lopes, M. A. (2011). Clinicopathological features and proliferation markers in tongue squamous cell carcinomas. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 40(5), 510-515.
- Gupta, A. K., Paquet, M., Villanueva, E., and Brintnell, W. (2012). Interventions for actinic keratoses. *Cochrane Database of systematic reviews*, (12).

- Gupta, B., Bray, F., Kumar, N., and Johnson, N. W. (2017). Associations between oral hygiene habits, diet, tobacco and alcohol and risk of oral cancer: a case-control study from India. *Cancer epidemiology*, 51, 7-14.
- Halonen, P., Jakobsson, M., Heikinheimo, O., Riska, A., Gissler, M., & Pukkala, E. (2018). Cancer risk of Lichen planus: A cohort study of 13,100 women in Finland. *International journal of cancer*, 142(1), 18-22.
- Harmar, A. J., Hills, R. A., Rosser, E. M., Jones, M., Buneman, O. P., Dunbar, D. R., ... & Catterall, W. A. (2009). IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D680-D685.
- Hashibe, M., Mathew, B., Kuruvilla, B., Thomas, G., Sankaranarayanan, R., Parkin, D. M., & Zhang, Z. F. (2000). Chewing tobacco, alcohol, and the risk of erythroplakia. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 9(7), 639-645.
- Hatzia Apostolou, M., & Iliopoulos, D. (2011). Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(10), 1681-1702.
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054.
- Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A., & Menck, H. R. (1998). The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 124(9), 951-962.
- Hosni, E. S., Salum, F. G., Cherubini, K., Yurgel, L. S., & Figueiredo, M. A. Z. (2009). Oral erythroplakia and speckled leukoplakia: retrospective analysis of 13 cases. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 75(2), 295-299.
- Hosseinpour, S., Mashhadiabbas, F., & Ahsaie, M. G. (2017). Diagnostic biomarkers in oral verrucous carcinoma: a systematic review. *Pathology & Oncology Research*, 23(1), 19-32.
- Huang, C. J., Chao, K. C., Tsai, J., Simpson, J. R., Haughey, B., Spector, G. J., & Sessions, D. G. (2001). Cancer of retromolar trigone: long-term radiation therapy outcome. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 23(9), 758-763.
- Huang, S. H., Hwang, D., Lockwood, G., Goldstein, D. P., & O'Sullivan, B. (2009). Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 115(7), 1489-1497.

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2004). Betel-quid and areca-nut chewing and some areca-nut derived nitrosamines. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 85, 1.
- Imanshi, S., Sugimoto, M., Morita, M., Kume, S., & Manabe, N. (2007). Changes in expression and localization of GPRC5B and RAR α in the placenta and yolk sac during middle to late gestation in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 0707190049-0707190049.
- Inoue, S., Nambu, T., & Shimomura, T. (2004). The RAIG family member, GPRC5D, is associated with hard-keratinized structures. *Journal of investigative dermatology*, 122(3), 565-573.
- Iocca, O., Sollecito, T. P., Alawi, F., Weinstein, G. S., Newman, J. G., De Virgilio, A., ... & Shanti, R. M. (2020). Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: a systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head & Neck*, 42(3), 539-555.
- Jiang, P., Cui, M., Zhao, B., Snyder, L. A., Benard, L. M., Osman, R., ... & Margolskee, R. F. (2005). Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34296-34305.
- 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*, 64(6), 896-901.
- Jithesh, P. V., Risk, J. M., Schache, A. G., Dhanda, J., Lane, B., Liloglou, T., & Shaw, R. J. (2013). The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*, 108(2), 370-379.
- Johnson, N. (2001). Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *Journal of dental education*, 65(4), 328-339.
- Joosten, S. C., Smits, K. M., Aarts, M. J., Melotte, V., Koch, A., Tjan-Heijnen, V. C., & van Engeland, M. (2018). Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. *Nature Reviews Urology*, 15(7), 430-451.
- Joshi, M. S., Verma, Y., Gautam, A. K., Parmar, G., Lakkad, B. C., & Kumar, S. (2011). Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of Oral Biology*, 56(1), 63-67.

- Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., & Goel, A. (2020). Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 1-20.
- Kato, K., Hara, A., Kuno, T., Mori, H., Yamashita, T., Toida, M., & Shibata, T. (2006). Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 132(11), 735-743.
- Kaur, R. R., Alikhan, A., & Maibach, H. I. (2010). Comparison of topical 5-fluorouracil formulations in actinic keratosis treatment. *Journal of dermatological treatment*, 21(5), 267-271.
- Keski-Säntti, H., Atula, T., Törnwall, J., Koivunen, P., & Mäkitie, A. (2006). Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral oncology*, 42(1), 95-100.
- Khan, T., Relitti, N., Brindisi, M., Magnano, S., Zisterer, D., Gemma, S., ... & Campiani, G. (2020). Autophagy modulators for the treatment of oral and esophageal squamous cell carcinomas. *Medicinal research reviews*, 40(3), 1002-1060.
- Kinney, S. R. M., & Pradhan, S. (2011). Regulation of expression and activity of DNA (cytosine-5) methyltransferases in mammalian cells. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 101, pp. 311-333). Academic Press.
- Kita, Y., Yonemori, K., Osako, Y., Baba, K., Mori, S., Maemura, K., & Natsugoe, S. (2017). Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role. *Journal of human genetics*, 62(1), 41-47.
- Kolakowski Jr, L. F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & channels*, 2(1), 1.
- Komal, K., Deshmukh, S. B., & Deshmukh, A. (2015). Verrucous carcinoma with oral submucous fibrosis: A rare case with brief review. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(8), ED06.
- Kopera, D., & Kerl, H. (2014). Visualization and treatment of subclinical actinic keratoses with topical imiquimod 5% cream: an observational study. *BioMed Research International*, 2014.
- Kramer, I. R. (1978). Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 46, 518-539.

- Kulkarni, V., & Saranath, D. (2004). Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology*, 40(2), 145-153.
- Kurago, Z. B. (2016). Etiology and pathogenesis of oral lichen planus: an overview. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 122(1), 72-80.
- Kurdistani, S. K. (2011). Histone modifications in cancer biology and prognosis. In *Epigenetics and Disease* (pp. 91-106). Springer, Basel.
- Kurokawa, H., Zhang, M., Matsumoto, S., Yamashita, Y., Tomoyose, T., Tanaka, T., ... & Takahashi, T. (2005). The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*, 34(6), 329-333.
- Lagergren, J., Smyth, E., Cunningham, D., & Lagergren, P. (2017). Oesophageal cancer. *The Lancet*, 390(10110), 2383-2396.
- Laird, P. W. (2005). Cancer epigenetics. *Human molecular genetics*, 14(suppl_1), R65-R76.
- Lajer, C. B., Nielsen, F. C., Friis-Hansen, L., Norrild, B., Borup, R., Garnaes, E., ... & Dabelsteen, S. (2011). Different miRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: a prospective translational study. *British journal of cancer*, 104(5), 830-840.
- Ledwitch, K., Ogburn, R., Cox, J., Graham, R., Fritzsche, A., Gosnell, D., & Manning, T. (2013). Taxol: efficacy against oral squamous cell carcinoma. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(4), 509-521.
- Lee, K. J., Abemayor, E., Sayre, J., Bhuta, S., & Kirsch, C. (2008). Determination of perineural invasion preoperatively on radiographic images. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 139(2), 275-280.
- Li, C. C., Shen, Z., Bavarian, R., Yang, F., & Bhattacharya, A. (2018). Oral cancer: genetics and the role of precision medicine. *Dental Clinics*, 62(1), 29-46.
- Li, Y., Bai, S., Carroll, W., Dayan, D., Dort, J. C., Heller, K., ... & Rosenthal, E. (2013). Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head and neck pathology*, 7(3), 211-223.
- Lin, H. J. L., Zuo, T., Chao, J. R., Peng, Z., Asamoto, L. K., Yamashita, S. S., & Huang, T. H. M. (2009). Seed in soil, with an epigenetic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(9), 920-924.

- Lin, H. W., & Bhattacharyya, N. (2009). Survival impact of nodal disease in hard palate and maxillary alveolus cancer. *The Laryngoscope*, 119(2), 312-315.
- Lindenblatt, R. D. C. R., Martinez, G. L., Silva, L. E., Faria, P. S., Camisasca, D. R., and Lourenço, S. D. Q. C. (2012). Oral squamous cell carcinoma grading systems—analysis of the best survival predictor. *Journal of oral pathology & medicine*, 41(1), 34-39.
- Liu, C., Xie, B., Yang, Y., Lin, D., Wang, C., Lin, M., ... & Zhou, H. (2013). Efficacy of intralesional betamethasone for erosive oral lichen planus and evaluation of recurrence: a randomized, controlled trial. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 116(5), 584-590.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... & Downing, J. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*, 435(7043), 834-838.
- Lubin, J. H., Purdue, M., Kelsey, K., Zhang, Z. F., Winn, D., Wei, Q., ... & Shangina, O. (2009). Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies. *American journal of epidemiology*, 170(8), 937-947.
- Lujambio, A., Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., ... & Gallagher, W. M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13556-13561.
- Machado, R. A., Moubayed, S. P., Hernandez-Prera, J. C., & Urken, M. L. (2016). Influence of previous treatment of oral squamous cell carcinoma on the geographic distribution of recurrent neck metastases: A case series of unusual level 4 metastases. *American journal of otolaryngology*, 37(5), 459-462.
- Madu, C. O., & Lu, Y. (2010). Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Journal of Cancer*, 1, 150.
- Maymone, M. B., Greer, R. O., Ksecker, J., Sahitya, P. C., Burdine, L. K., Cheng, A. D., ... & Vashi, N. A. (2018). Premalignant and malignant mucosal lesions: clinical and pathological findings part II. Premalignant and malignant mucosal lesions. *J Am Acad Dermatol*.
- Mehanna, H. M., Rattay, T., Smith, J., & McConkey, C. C. (2009). Treatment and follow-up of oral dysplasia—a systematic review and meta-analysis. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 31(12), 1600-1609.

- Monteiro, L., Barbieri, C., Warnakulasuriya, S., Martins, M., Salazar, F., Pacheco, J. J., ... & Meleti, M. (2017). Type of surgical treatment and recurrence of oral leukoplakia: a retrospective clinical study. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 22(5), e520.
- Moy, R. L. (2000). Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(1), S8-S10.
- Olson, M. A., Rogers III, R. S., & Bruce, A. J. (2016). Oral lichen planus. *Clinics in dermatology*, 34(4), 495-504.
- Omar, Esam Ahmad. 2013. "The Outline of Prognosis and New Advances in Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC): Review of the Literature." *Journal of Oral Oncology* 2013(ii): 1–13.
- Overholt, S. M., Eicher, S. A., Wolf, P., & Weber, R. S. (1996). Prognostic factors affecting outcome in lower gingival carcinoma. *The Laryngoscope*, 106(11), 1335-1339.
- Patra, S. K., Deb, M., & Patra, A. (2011). Molecular marks for epigenetic identification of developmental and cancer stem cells. *Clinical epigenetics*, 2(1), 27-53.
- Pendleton, K. P., & Grandis, J. R. (2013). Cisplatin-based chemotherapy options for recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*, 5, CMT-S10409.
- Peng, Q., Wang, Y., Quan, H., Li, Y., & Tang, Z. (2016). Oral verrucous carcinoma: From multifactorial etiology to diverse treatment regimens. *International journal of oncology*, 49(1), 59-73.
- Peter, M. E. (2009). Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell cycle*, 8(6), 843-852.
- Platz, H., Fries, R., Hudec, M., Tjoa, A. M., & Wagner, R. R. (1983). The prognostic relevance of various factors at the time of the first admission of the patient: retrospective DÖSAK study on carcinoma of the oral cavity. *Journal of maxillofacial surgery*, 11, 3-12.
- Porter, Stephen, Luiz Alcino Gueiros, Jair Carneiro Leão, and Stefano Fedele. 2018. "Risk Factors and Etiopathogenesis of Potentially Premalignant Oral Epithelial Lesions." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 125(6).
- Rajkumar, Premraj et al. 2018. "Identifying the Localization and Exploring a Functional Role for Gprc5c in the Kidney." *FASEB Journal* 32(4): 2046–59.

- Rajnee Kanwal, Karishma Gupta, and Sanjay Gupta. 2014. "Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis." *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis* 1238: 1–799.
- Ranganathan, K., & Kavitha, L. (2019). Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 23(1), 19.
- Reed, Susan G., and Amy E. Wahlquist. 2015. "Adults with Oral High-Risk Human Papillomavirus (HPV) and/or Smoking History Have a Higher Risk for Clinically Diagnosed Oral Premalignant Lesions." *Journal of Evidence-Based Dental Practice* 15(3): 134–36.
- Reibel, J. (2003). Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(1), 47-62.
- Reichart, P. A., & Philipsen, H. P. (2005). Oral erythroplakia—a review. *Oral oncology*, 41(6), 551-561.
- Rhodus, N. L., Kerr, A. R., & Patel, K. (2014). Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma. *Dental Clinics*, 58(2), 315-340.
- Richart, R. M., & Barron, B. A. (1969). A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 105(3), 386-393.
- Rivenbark, A. G., & Coleman, W. B. (2007). Practical applications for epigenetic biomarkers in cancer diagnostics. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*, 1(1), 17-30.
- Robbins, M. J., Charles, K. J., Harrison, D. C., & Pangalos, M. N. (2002). Localisation of the GPRC5B receptor in the rat brain and spinal cord. *Molecular brain research*, 106(1-2), 136-144.
- Robbins, M. J., Michalovich, D., Hill, J., Calver, A. R., Medhurst, A. D., Gloger, I., ... & Pangalos, M. N. (2000). Molecular cloning and characterization of two novel retinoic acid-inducible orphan G-protein-coupled receptors (GPRC5B and GPRC5C). *Genomics*, 67(1), 8-18.
- Rodgers Jr, 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*, 15(1), 16-19.
- Rodríguez-Paredes, M., & Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature medicine*, 17(3), 330-339.

- Ross, R. A., Walton, J. D., Han, D., Guo, H. F., & Cheung, N. K. V. (2015). A distinct gene expression signature characterizes human neuroblastoma cancer stem cells. *Stem cell research*, 15(2), 419-426.
- Rosen, T., & Lebwohl, M. G. (2013). Prevalence and awareness of actinic keratosis: barriers and opportunities. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 68(1), S2-S9.
- Rossi, R., Mori, M., & Lotti, T. (2007). Actinic keratosis. *International journal of dermatology*, 46(9), 895-904.
- Röwert-Huber, J., Patel, M. J., Forschner, T., Ulrich, C., Eberle, J., Kerl, H., ... & Stockfleth, E. (2007). Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *British Journal of Dermatology*, 156, 8-12.
- Salama, J. K., Saba, N., Quon, H., Garg, M. K., Lawson, J., McDonald, M. W., ... & Beitler, J. J. (2011). ACR appropriateness criteria® adjuvant therapy for resected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*, 47(7), 554-559.
- Sano, Takamitsu et al. 2011. "Comparative Characterization of GPRC5B and GPRC5C LacZ Knockin Mice; Behavioral Abnormalities in GPRC5B-Deficient Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412(3): 460–65.
- Schmitz, S., Ang, K. K., Vermorken, J., Haddad, R., Suarez, C., Wolf, G. T., ... & Machiels, J. P. (2014). Targeted therapies for squamous cell carcinoma of the head and neck: current knowledge and future directions. *Cancer treatment reviews*, 40(3), 390-404.
- Scully, C., & Bagan, J. (2009). Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral oncology*, 45(4/5), 301-308.
- Shack, R. B. (1986). Carcinoma of the tongue and tonsil (oropharynx). *The Surgical clinics of North America*, 66(1), 83-96.
- 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*, 148(4), 455-459.
- Shanbhag, V. K. L. (2017). New definition proposed for oral leukoplakia. *Dental Research Journal*, 14(4), 297.
- Sharma, P., Wadhwan, V., Aggarwal, P., & Sharma, A. (2016). Oral verrucous hyperplasia versus oral verrucous carcinoma: A clinicopathologic dilemma revisited using p53 as immunohistochemical marker. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 20(3), 362.
- Shinjo, K., & Kondo, Y. (2015). Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 95, 56-64.

- Shivapurkar, N., & Gazdar, A. F. (2010). DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Current molecular medicine*, 10(2), 123-132.
- Siebers, T. J. H., Merks, M. A. W., Slootweg, P. J., Melchers, W. J. G., Van Cleef, P., & de Wilde, P. C. M. (2008). No high-risk HPV detected in SCC of the oral tongue in the absolute absence of tobacco and alcohol—a case study of seven patients. *Oral and maxillofacial surgery*, 12(4), 185-188.
- Siegel, J. A., K. Korgavkar, and M. A. Weinstock. 2017. “Current Perspective on Actinic Keratosis: A Review.” *British Journal of Dermatology* 177(2): 350–58.
- Sinha, D. N., Abdulkader, R. S., & Gupta, P. C. (2016). Smokeless tobacco-associated cancers: A systematic review and meta-analysis of Indian studies. *International journal of cancer*, 138(6), 1368-1379.
- Sinha, P., Mehrad, M., Chernock, R. D., Lewis Jr, J. S., El-Mofty, S. K., Wu, N., ... & Haughey, B. H. (2015). Histologic and systemic prognosticators for local control and survival in margin-negative transoral laser microsurgery treated oral cavity squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 37(1), 52-63.
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963-968.
- Sonalika, W. G., & Anand, T. (2016). Oral verrucous carcinoma: a retrospective analysis for clinicopathologic features. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(1), 142.
- Soodan KS, Priyadarshni P, Kumar MSS. 2018. “EC DENTAL SCIENCE Review Article Systematic Review on Oral Cancer.” *EC Dental Science* 3: 116–19.
- 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*, 145(2), 242-247.
- Speight, P. M., Khurram, S. A., & Kujan, O. (2018). Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 125(6), 612-627.
- Sperandio, M., Brown, A. L., Lock, C., Morgan, P. R., Coupland, V. H., Madden, P. B., ... & Odell, E. W. (2013). Predictive value of dysplasia grading and DNA ploidy in malignant transformation of oral potentially malignant disorders. *Cancer Prevention Research*, 6(8), 822-831.

- Staines, K., & Rogers, H. (2017). Oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia: a review for dental practitioners. *British Dental Journal*, 223(9), 655-661.
- Svoronos, A. A., Engelman, D. M., & Slack, F. J. (2016). OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer research*, 76(13), 3666-3670.
- Tan, N. C., Mellor, T., Brennan, P. A., & Puxeddu, R. (2011). Use of narrow band imaging guidance in the management of oral erythroplakia. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 49(6), 488-490.
- Teichgraeber, J. F., & Clairmont, A. A. (1984). The incidence of occult metastases for cancer of the oral tongue and floor of the mouth: treatment rationale. *Head & neck surgery*, 7(1), 15-21.
- Termine, N., Panzarella, V., Falaschini, S., Russo, A., Matranga, D., Lo Muzio, L., & Campisi, G. (2008). HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Annals of Oncology*, 19(10), 1681-1690.
- Tessarz, P., & Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(11), 703-708.
- Thompson, L. D. (2006). World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, Nose and Throat Journal*, 85(2), 74-75.
- Thomson, P. J., Goodson, M. L., & Smith, D. R. (2018). Potentially malignant disorders revisited—The lichenoid lesion/proliferative verrucous leukoplakia conundrum. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 47(6), 557-565.
- Tilakaratne, W. M. et al. 2006a. “Oral Submucous Fibrosis: Review on Aetiology and Pathogenesis.” *Oral Oncology* 42(6): 561–68
- Tilakaratne, W. M., Klinikowski, M. F., Saku, T., Peters, T. J., & Warnakulasuriya, S. (2006b). Oral submucous fibrosis: review on aetiology and pathogenesis. *Oral oncology*, 42(6), 561-568.
- Ulrich, M., Krueger-Corcoran, D., Roewert-Huber, J., Sterry, W., Stockfleth, E., & Astner, S. (2010). Reflectance confocal microscopy for noninvasive monitoring of therapy and detection of subclinical actinic keratoses. *Dermatology*, 220(1), 15-24.
- Urist, M. M., O'Brien, C. J., Soong, S. J., Visscher, D. W., & Maddox, W. A. (1987). Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *The American Journal of Surgery*, 154(4), 411-414.

- Vargas-Ferreira, F., Nedel, F., Etges, A., Gomes, A. P. N., Furuse, C., & Tarquinio, S. B. C. (2012). Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Brazilian dental journal*, 23(5), 586-590.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., ... & Bergmann, J. E. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4903-4908.
- Ventorin von Zeidler, S., Miracca, E. C., Nagai, M. A., & Birman, E. G. (2004). Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *International journal of molecular medicine*, 14(5), 807-811.
- Vered, M., Dayan, D., Dobriyan, A., Yahalom, R., Shalmon, B., Barshack, I., ... & Taicher, S. (2010). Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(7), 1039-1048.
- Vered, M., Dobriyan, A., Dayan, D., Yahalom, R., Talmi, Y. P., Bedrin, L., ... & Taicher, S. (2010). Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer science*, 101(1), 274-280.
- Villa, A., Villa, C., & Abati, S. (2011). Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Australian dental journal*, 56(3), 253-256.
- Walton, J. D., Kattan, D. R., Thomas, S. K., Spengler, B. A., Guo, H. F., Biedler, J. L., ... & Ross, R. A. (2004). Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*, 6(6), 838-845.
- Wang, C., Huang, H., Huang, Z., Wang, A., Chen, X., Huang, L., ... & Liu, X. (2011). Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine*, 40(7), 545-551.
- Wang, Q. L., Xie, S. H., Li, W. T., & Lagergren, J. (2017). Smoking cessation and risk of esophageal cancer by histological type: systematic review and meta-analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 109(12).
- Warnakulasuriya, K. A. A. S., & Ralhan, R. (2007). Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco—a review. *Journal of oral pathology & medicine*, 36(2), 63-77.

- Warnakulasuriya, S., Dietrich, T., Bornstein, M. M., Peidró, E. C., Preshaw, P. M., Walter, C., ... & Bergström, J. (2010). Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *International dental journal*, 60(1), 7-30.
- Warnakulasuriya, S., Johnson, N. W., & Van der Waal, I. (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of oral pathology & medicine*, 36(10), 575-580.
- Warnakulasuriya, S., Kovacevic, T., Madden, P., Coupland, V. H., Sperandio, M., Odell, E., & Møller, H. (2011). Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. *Journal of oral pathology & medicine*, 40(9), 677-683.
- Webber, L. P., Wagner, V. P., Curra, M., Vargas, P. A., Meurer, L., Carrard, V. C., ... & Martins, M. D. (2017). Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*, 71(2), 278-286.
- Weber, R. S., Guillamondegui, O. M., Byers, R. M., Palmer, J. M., El-Naggar, A., & Mcneese, M. D. (1989). Minor salivary gland tumors of the lip and buccal mucosa. *The Laryngoscope*, 99(1), 6-9.
- Wei, S. H., Balch, C., Paik, H. H., Kim, Y. S., Baldwin, R. L., Liyanarachchi, S., ... & Karlan, B. Y. (2006). Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(9), 2788-2794.
- Woolgar, J. A. (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 42(3), 229-239.
- Xu, J., Tian, J., & Shapiro, S. D. (2005). Normal lung development in RAIG1-deficient mice despite unique lung epithelium-specific expression. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 32(5), 381-387.
- Yamaga, Ryonosuke et al. 2014. "Systemic Identification of Estrogen-Regulated Genes in Breast Cancer Cells through Cap Analysis of Gene Expression Mapping." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 447(3): 531–36.
- Yan, Ting Lin et al. 2017. "Up-Regulation of Syncytin-1 Contributes to TNF- α -Enhanced Fusion between OSCC and HUVECs Partly via Wnt/ β -Catenin-Dependent Pathway." *Scientific Reports* 7(September 2016): 1–12
- Yang, S. W., Lee, Y. S., Chang, L. C., Hsieh, T. Y., & Chen, T. A. (2015). Outcome of excision of oral erythroplakia. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 53(2), 142-147.

Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature reviews Drug discovery*, 5(1), 37-50.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ORAL KAVİTENİN MALİN VE PREMALİN LEZYONLARINDA GPRC5C GENİNİN GENETİK VE EPİGENETİK PROFİLİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%8	%4	%2	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%4
2	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
3	opus.bibliothek.uni-augsburg.de İnternet Kaynağı	<%1
4	www.medikalakademi.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.pjperry.freeuk.com	