

METEHAN KARATAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA
GLYCOPHORIN C (GYPC) GENİNİN METİLASYON VE
EKSPRESYON SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

METEHAN KARATAŞ

DANIŞMAN
PROF.DR. SEMRA DEMOKAN

TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ BİLİM DALI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Deneysel ve Moleküler Onkoloji Bilim Dalı Programında Yüksek Lisans öğrencisi Metehan KARATAŞ tarafından Prof.Dr. Semra DEMOKAN'nın danışmanlığında hazırlanan "Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda Glycophorin C (GYPC) Genin Metilasyon ve Ekspresyon Seviyelerinin İncelenmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Hülya YAZICI ÖZBEK
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri-Danışman

Prof.Dr. Semra DEMOKAN
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr. Vakur OLGAÇ
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr. Meral YÜKSEL
Marmara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Meslek Yüksek Okulu
Tıbbi Lab. Teknikleri Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr. Murat ULUSAN
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

BEYAN

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

Metehan KARATAŞ



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

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

Temel araştırmaların saygınlığı ve devamlılığı konusundaki kararlılığını gözlemleyerek çok şey öğrendiğim, yüksek lisans eğitimimde bilgi ve birikimini benden esirgemeyen; tez çalışmam boyunca çalışmalarımı yönlendiren, fikir ve önerileriyle bana yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım **Prof. Dr. Semra DEMOKAN**'a,

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

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli çalışma arkadaşlarım **Önder ERYILMAZ, Sena ŞEN, Begüm Bürke BULUŞLU, Kübra Gizem ESENTÜRK, Nadin BEDİKYAN, Işıl Melis ZÜMRÜT, Hüseyin Enes DERYA, Fulya KARAYEĞİT ve Madona GJONA**'ya,

Tüm eğitim sürecim boyunca maddi ve manevi her zaman yanımda olan, tavsiye ve özverilerini eksik etmeyen sevgili annem **Nevin KURT**, babam **Yunus KARATAŞ**, kardeşim **Kerem KARATAŞ**, merhum teyzem **Nermin DELİBAŞI**, kuzenlerim **Arzu DELİBAŞI, Melike ÇEPNİ ve Sadettin ŞAHİN**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

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

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-32628

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC).....	5
2.1.1. Oral Kavite Anatomisi	5
2.1.2. OSCC Epidemiyolojisi.....	6
2.1.3. OSCC Etiyolojisi.....	7
2.1.4. OSCC Histopatolojisi.....	9
2.1.5. OSCC Belirtileri.....	12
2.1.6. OSCC Prognostik Faktörler	13
2.1.7. OSCC Evreleme	14
2.1.8. OSCC'nin Önlenmesi ve Kontrolü	29
2.1.9. OSCC Tedavisi	29
2.1.10. OSCC'nin Moleküler Biyolojisi	30
2.2. Epigenetik	32
2.2.1. Histon Modifikasyonları	33
2.2.2. miRNA Regülasyonu	35
2.2.3. Kromatin Yeniden Düzenlemesi	36
2.2.4. Biyobelirteç	37
2.3. DNA Metilasyonu	39

2.3.1. DNA Hipometilasyonu	39
2.3.2. DNA Hipermetilasyonu	39
2.4. <i>Glycophorin C (GYPC)</i>	41
2.4.1. <i>GYPC</i> ve Kansere İlişkisi	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3.1. MATERYAL	45
3.1.1. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Cihazlar	45
3.1.2. Deneylerin Gerçekleştirilmesi Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.1.3. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Kullanılan Kimyasal Karışımlar	46
3.2. YÖNTEMLER.....	48
3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi	48
3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri	48
3.2.3. Total RNA İzolasyonu	51
3.2.4. Metilasyon Ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı.....	51
3.2.5. Metilasyon Analizi.....	52
3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi.....	55
3.2.7. Veri Analizi.....	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. Hastalara Ait Klinikopatolojik Veriler ile Sağlıklı Bireylere Ait Demografik Parametrelerin Özellikleri.....	59
4.2. <i>GYPC</i> Geninin Metilasyon Analiz Sonuçları	61
4.3. <i>GYPC</i> Genin Ekspresyon Analiz Sonuçları.....	64
4.4. Metilasyona Bağlı Ekspresyon Seviyesi Değişimi	69
5. TARTIŞMA	73
KAYNAKLAR	77
HAM VERİLER	85
FORMLAR	86
ETİK KURUL.....	87
PATENT HAKKI İZNİ	88
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	89
ÖZGEÇMİŞ	92

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2- 1. Oral Kanserlerin Sınıflandırılması.	10
Tablo 2- 2. Oral skuamöz hücreli karsinomun prognostik faktörleri	14
Tablo 2- 3. p16 negatif durumuna göre evrelendirme.	15
Tablo 2- 4. p16 pozitif durumuna göre evrelendirme.	17
Tablo 2-5. Oral skuamöz hücreli karsinomda sık görülen moleküler anormallikler	31
Tablo 2- 6. OSCC'de hipermetile aday genlerin potansiyel biyobelirteç uygulamalarına göre sınıflandırılması	38
Tablo 2- 7. En sık bildirilen kanser türlerinde promoter hipermetilasyonuna uğrayan genler	41
Tablo 3- 1. Kimyasal Maddeler.	46
Tablo 3- 2. Kimyasal Karışımlar.	47
Tablo 3- 3. Dokudan DNA izolasyon işlemi.	49
Tablo 3- 4. Serumdan DNA izolasyon işlemi	50
Tablo 3- 5. RNA izolasyon işlemi	51
Tablo 3- 6. Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan <i>GYPC</i> geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers)	52
Tablo 3- 7. Referans ACTB geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers)	52
Tablo 3- 8. Bisülfıt DNA dönüşüm protokolü	53
Tablo 3- 9. Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon karışımı.	54
Tablo 3- 10. Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon koşulları.	55
Tablo 3- 11. cDNA sentezi reaksiyon karışımı.....	56
Tablo 3- 12. cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	56
Tablo 3- 13. Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı.....	57
Tablo 3- 14. Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon koşulları.....	57
Tablo 4- 1. OSCC hastalarına ait klinik parametreler.	60
Tablo 4- 2. Sağlıklı bireylere ait demografik parametreler.	61
Tablo 4- 3. Anatomik tutulum bölgelerine göre ekspresyon seviyeleri.....	69
Tablo 4- 4. Metilasyon ve ekspresyon değişikliklerinin gösterimi.....	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2- 1. Amerika'daki 2017 yılına ait kanser insidansı	3
Şekil 2-2. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımlar	4
Şekil 2-3. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımlar	4
Şekil 2- 4. Oral kavitenin anatomik bölgeleri.....	6
Şekil 2- 5. Oral kanser insidansı ve mortalitesi yüksek olan ülkeler.....	7
Şekil 2- 6. Oral kavite kanserlerinin histopatolojik alt tipleri.....	11
Şekil 2- 7. Oral karsinogenezin genetik progresyon modeli.....	31
Şekil 2- 8. Kansere yol açan genetik ve epigenetik mekanizmalar	33
Şekil 2- 9. Çekirdek histonların translasyon sonrası modifikasyonları	34
Şekil 2- 10. Kromatin remodelers aileleri.....	37
Şekil 2- 11. Glycophorin ailesi ve Bant 3'ün Eritrositlerdeki lokasyonu	42
Şekil 4- 1. %100 metile standart ve dilüsyonlarının ACTB genine ait amplifikasyon eğrileri.....	62
Şekil 4- 2. %100 metile standart ve dilüsyonlarının hedef GYPC genine ait eğrileri. ...	62
Şekil 4- 3. %100 metile standart ve dilüsyonlarında ACTB ve GYPC genlerine ait standart eğri.....	63
Şekil 4- 4. OSCC hastalarına ait tümör, eşlenik normal ve serum örneklerindeki metilasyon durumu.	63
Şekil 4- 5. Sağlıklı bireylere ait örneklerde metilasyon durumunu gösteren çoğalma eğrileri.....	64
Şekil 4- 6. Sağlıklı bireylerden alınan doku ve serum örneklerinin metilasyon durumları.	64
Şekil 4- 7. Tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla GYPC ekspresyon seviyesi.	65
Şekil 4- 8. OSCC hastalarının tümör, eşlenik normal ve serum örneklerinin ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2\Delta Ct$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi.	66
Şekil 4- 9. Sağlıklı bireylerin sağlıklı normal mukoza ve serum materyallerindeki ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2\Delta Ct$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi.	67

Şekil 4- 10. GYPC ekspresyon düzeyleri ile referans genin (β -actin) tümör (T) ve eşlenik normal (N) doku örneklerindeki ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak hesaplanması.	68
Şekil 4- 11. Malin grup tümör dokusu ile eşlenik normal dokusu arasındaki GYPC metilasyonunun ROC analizi.	71
Şekil 4- 12. Malin grup tümör dokusu ile sağlıklı grup normal dokusu GYPC metilasyonunun ROC analizi.	72



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
IARC	:Uluslararası Kansere Ajansı
AJCC	:Amerikan Kansere Komitesi
OSCC	:Oral skuamöz hücreli karsinom
HNC	:Baş-boyun kanserleri
DNA	:Deoksiribonükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
cDNA	:Komplementer DNA
BC-DNA	:Bisülfite modifiye edilmiş DNA
QMSP	:Kantitatif metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
QRT-PCR	:Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<i>GYPC</i>	: <i>Glycophorin C</i> geni
<i>ACTB</i>	: <i>Beta Actin</i> geni
mRNA	:Mesajcı RNA
DNMT	:DNA metiltransferaz
TSG	:Tümör baskılayıcı gen
FAM	:6-floroseinamidit
TAMRA	:Karboksitetrametilrodamin
LOH	:Heterozigotluk kaybı
HPV	:Human Papilloma Virus
EBV	:Epstein-Barr virüs
HIV	:İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü

ÖZET

Karataş, M. Oral skuamöz hücreli karsinomda *Glycophorin C (GYPC)* geninin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019.

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), alkol ve tütün kullanımı, coğrafi bölge, kötü ağız hijyeni gibi faktörlerin insidans ve mortalite oranlarını etkilediği oral kavite karsinomunun en sık görülen türüdür. Prof. Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının tamamladığı TÜBİTAK-SBAG-114S497 nolu projesinde OSCC hastalarına ait tümör ve eşlenik normal dokularda tespit edilen ekspresyon ve metilasyon array sonuçlarının biyoinformatik analizine göre *Glycophorin C (GYPC)* geninin CpG adacıklarının metillenmiş olduğu ve bu duruma bağlı olarak ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. *GYPC* geni, eritrositler tarafından taşınan ve membrana entegre olabilen GPC ile GPD proteinlerini kodlayarak, kırmızı kan hücrelerinde zar stabilitesini sağlar. Kanser gelişiminde DNA hipermetilasyonu gen ifadesini baskılaması sonucu karsinogeneizde önemli bir rol oynamaktadır.

Çalışmamızda *GYPC* genindeki metilasyon durumunun OSCC’de erken tanı ve prognozda kullanılabilecek bir biyobelirteç olabilme potansiyeli araştırıldı. OSCC tanısı konulan 50 hasta ve 10 sağlıklı bireyin doku ve serum örneklerinin metilasyon ve ekspresyon durumunu incelemek için sırasıyla QMSP ve QRT-PCR yöntemi kullanıldı. Elde edilen bulgular ile klinik parametreler karşılaştırılarak istatistik analizi değerlendirildi. *GYPC* geninde, hastaların tümör dokusunun %48’inde (24/50) metilasyon gözlenirken; %50’ inde (25/50) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya göre ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlendi. Tümör dokusunda metilasyon gözlenen 24 hastanın %52’sinde (13/25) metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalış gözlemlendi. *GYPC* geninin ekspresyon azalışı ile metastaz ($p=0,006$), tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastalar ile lenf nodu tutulumu ($p=0,011$) ve metastaz ($p=0,044$) arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur. Buna ek olarak metilasyona bağlı ekspresyon azalışı durumu ile sigara ($p=0,019$), alkol tüketimi ($p=0,031$) ve metastaz ($p=0,019$) arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: metilasyon, gen ekspresyonu, epigenetik biyobelirteç, oral skuamöz hücreli karsinom, *GYPC* geni

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-32628

ABSTRACT

Karataş, M. Investigation of methylation and expression levels of *Glycophorin C* (*GYPC*) gene in oral squamous cell carcinoma. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Basic Oncology. Master Thesis. Istanbul. 2019.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common type of oral cancer and the ethiological factors such as alcohol and tobacco consumption, geographical region, poor oral hygiene affect the incidence and mortality rates of this disease. In the TUBITAK-SBAG-114S497 project completed by Semra Demokan et al., According to bioinformatics analysis of methylation and expression array results, cpg islets of the *Glycophorin* (*GYPC*) gene were methylated and expression levels were decreased in tumor and conjugated normal tissues of OSCC patients. *GYPC* encodes the GPC and GPD proteins that can be integrated into the membrane in erythrocytes and provides membrane stability of red blood cells. DNA hypermethylation plays an important role in erythrocytes and carcinogenesis as a result of suppressing gene expression in cancer development.

In this study, we investigated the potential of methylation status in the *GYPC* gene as a biomarker for early diagnosis and prognosis in OSCC. In our study, tissue and serum samples of 50 patients diagnosed with OSCC and 10 healthy individuals were examined in order to investigate methylation and expression status by QMSP and QRT-PCR methods, respectively. Methylation and expression levels of *GYPC* gene was observed 48% (24/50) of the patients, separately. Methylation-based expression decrease observed in 12 of 24 patients who had methylation in tumor tissue. Statistically significant difference was found between *GYPC* expression decrease with metastasis ($p=0,006$) and methylation with lymph node involvement ($p=0.011$) and metastasis ($p=0,044$). In addition, significant differences found with methylation-based expression levels and smoking ($p=0,019$), metastasis ($p=0,019$), alcohol consumption ($p=0,031$).

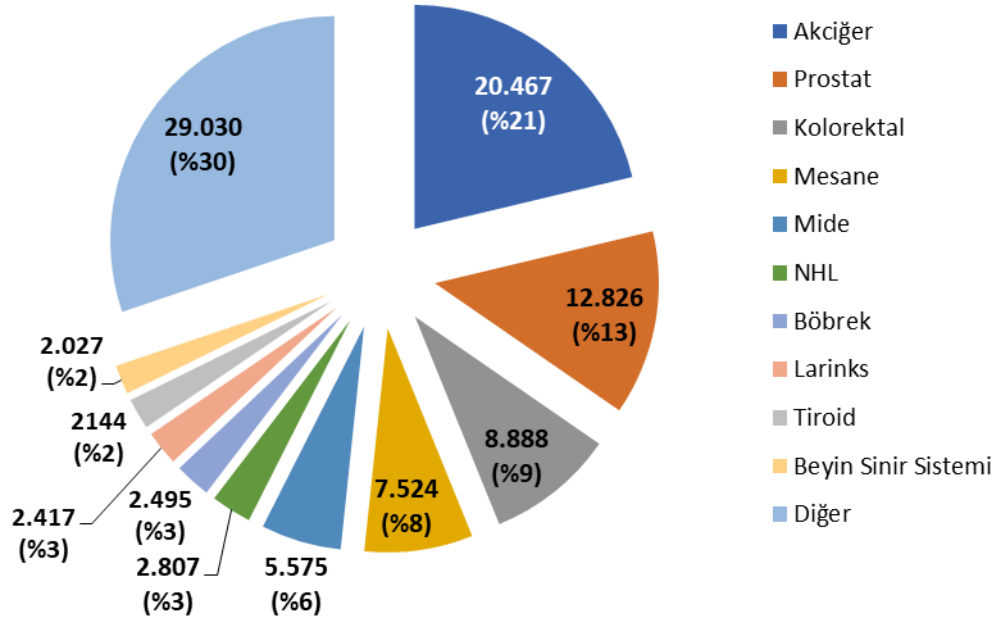
Key Words: methylation, gene expression, epigenetic biomarker, oral squamous cell carcinoma, *GYPC* gene

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2018-32628

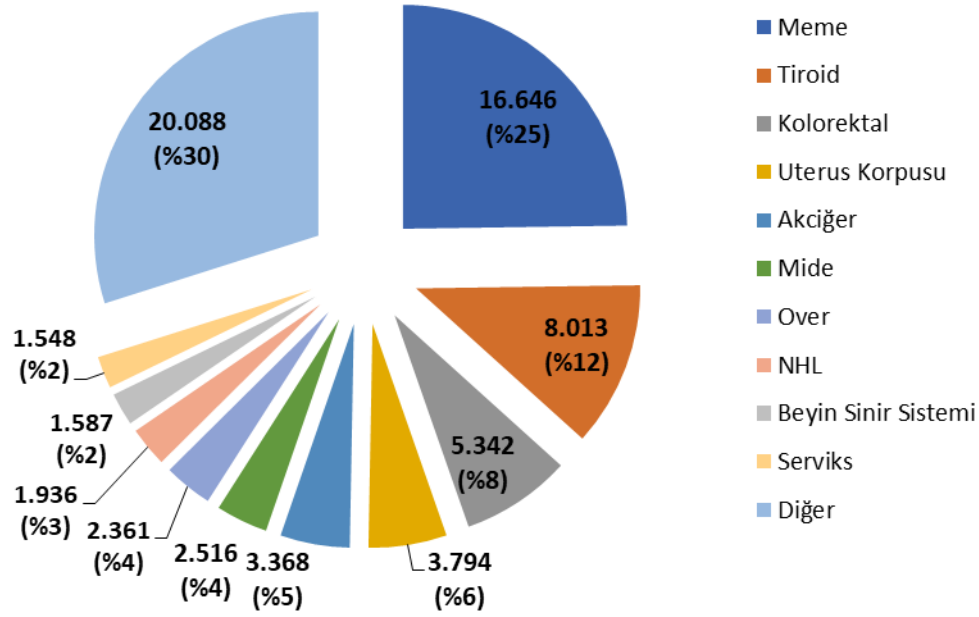
1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC), oral kavite karsinomunun en sık görülen ve dünyadaki en yaygın 12. kanser türüdür (1). OSCC, gelişmekte olan ülkelerde yüksek insidans oranına sahiptir (2) ve Dünya Sağlık Örgütü, önümüzdeki yıllarda bu insidans oranının artmasını öngörmektedir. ABD'de yıllık teşhis edilen malinitelerin %2-4'ünü OSCC temsil etmektedir (3). Erkeklerde 8. kadınlarda ise en sık görülen 5. kanserdir. Tedavideki önemli gelişmelere rağmen, tümör büyümesinin kontrol edilememesi ve nüks gözlenmesine ek olarak erken teşhis için uygun biyobelirteçlerin bulunmaması sebebiyle tanı sonrası 5 yıllık sağkalım oranı düşüktür. Bu nedenle, erken tanı için biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (4). Alkol ve tütün kullanımı, yaş, beslenme alışkanlıkları, etnik köken, coğrafik bölge gibi etiyolojik faktörler OSCC'nin insidansı ve mortalite oranlarını etkilemektedir (5). Kanserde epigenetik değişiklikler de önemli rol oynamaktadır. Birçok kanser tipindeki tümör hücreleri, sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldığında tümör baskılayıcı genlerin promoter bölgesindeki CpG adacıklarının metillendiği ve bundan dolayı bu gen ifadesinde azalma olduğu bilinmektedir (6). Prof.Dr. Semra Demokan ve arkadaşlarının TÜBİTAK-SBAG-114S497 nolu projesinde OSCC hastalarına ait tümör/eşlenik normal dokularında gerçekleştirilen ekspresyon ve metilasyon array deney sonuçlarına göre *GYPC* geninin CpG adacıklarının metillenmiş olduğu ve buna bağlı olarak ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir. *GYPC* geni, 2. kromozomun q kolunun 14. bandına lokalize olup eritrositler tarafından taşınan ve membrana entegre olabilen Glikophorin C proteinini kodlamakla birlikte Glycophorin A/B ile de benzer özellikler göstermektedir. *GYPC* geni, alternatif translasyon başlangıç bölgelerini kullanarak Glikophorin C (GPC) ve Glikophorin D'yi (GPD) kodlar. GPC ve GPD, protein 4.1R ve p55 ile etkileşime girer ve kırmızı kan hücrelerinde zar stabilitesini sağlar (7). GPC eksikliği sonucu kalıtsal eliptositoz görülmektedir. Gerbich kan grubu sistemi glikophorin C (GPC), glikophorin D (GPD) veya GPC ve GPD'de ifade edilen 6 yüksek prevalans ve 5 düşük prevalans antijeni içerir. Gebrich kan grubu sistemindeki antijenler, her ikisi de tek bir gen olan *GYPC* tarafından kodlanan GPC ve GPD üzerinde ifade edilir (8). *GYPC* geninin bazı bölgelerinde meydana gelen tekli nükleotid polimorfizmler (SNPs)'in interstisyel akciğer hastalığına yol açtığı (9) ve bu gendeki ekspresyon azalmasının akut miyeloid lösemiyle (10), artışının ise akut lenfoblastik lösemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (11). Buna ek olarak *GYPC* geninin meme kanserindeki bir DNA metilasyon korelasyon ağında yüksek ve düşük risk gruplarını ayırmada rol oynayabileceği bildirilmiştir (12).

Literatürde, *GYPC* geninin OSCC hastalarında metilasyon ve ekspresyon değişimini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, OSCC hastalarından temin edilen tümör/eşlenik doku materyallerinde *GYPC* geninin metilasyon ve ekspresyon durumlarını araştırmak için ileri validasyon çalışmaları yapılmıştır. *GYPC* geninin promoter bölgesindeki metilasyona bağlı ekspresyon değişikliklerini de incelenerek biyobelirteç olarak kullanım potansiyeli değerlendirildi. Ayrıca çalışmada sağlıklı kontrol grubuna ait doku ve serum örneklerinden elde edilen veriler ile OSCC'li hastalara ait veriler karşılaştırılarak çalışmanın güvenilirliği test edilmiştir. Buna ek olarak, bu hastalardan alınan serum materyallerinde metilasyon varlığı incelenerek, *GYPC* geninin invaziv yöntemlerle vücut sıvılarında tanı, teşhis ve tedavide potansiyel biyobelirteç olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.



Şekil 2- 2. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (15).



Şekil 2- 3. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (15).

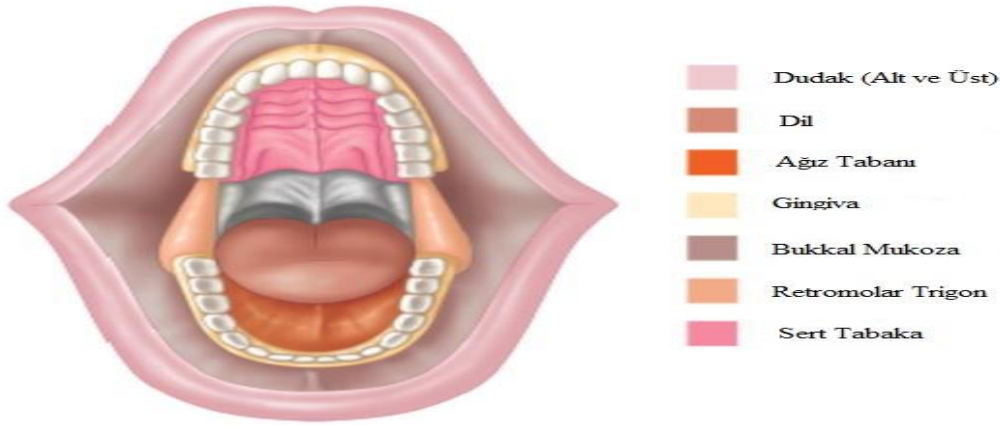
Kanser; sağlıklı bir hücrenin içerisinde gerçekleşen uyarılma, farklılaşma, bölünebilme ve gerektiğinde ölüm gibi işlevlerini düzenleyen mekanizmalarda meydana gelen bir hasar sonucuyla hücrede meydana gelen kontrolsüz bölünmesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser oluşumu genetik ve epigenetik mekanizmalarda meydana gelen değişikliklerin toplamı sonucu oluşmaktadır (16).

2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC)

OSCC, baş boyun kanserleri içerisinde en yaygın kanser türüdür. OSCC tüm dünyada en sık görülen kanserlerden biri olmakla beraber gelişmekte olan ülkelerde yüksek insidans oranına sahiptir (2). OSCC'nin en sık tutulum gösterdiği bölgeler dil, ağız, tabanı, sert damak ve alveolar arkus olmakla beraber retromolar trigon bölgesinde nadiren tutulum görülmektedir (17). Alkol ve tütün kullanımı, yaş, beslenme alışkanlıkları, etnik köken, coğrafik bölge gibi etiyolojik faktörler OSCC'nin insidansı ve mortalite oranlarını etkilemektedir (5). Kanserde epigenetik değişiklikler de önemli rol oynamaktadır. Birçok kanser tipindeki tümör hücreleri, sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldığında tümör baskılayıcı genlerinde mevcut olan promoter bölgesindeki CpG adacıklarının metillendiği ve bundan dolayı bu genlerin çalışmasını engellediği gözlemlenmiştir (6).

2.1.1. Oral Kavite Anatomisi

Ağız öncelikle beslenme, havalandırma ve seslendirme görevlerine sahiptir. Yine ağız içerisinde yer alan tükrük bezleri ağız boşluğunun bir parçası olmasa da ağız boşluğu ile yakın ilişki içerisinde (18). Ağız boşluğu (oral kavite), birkaç anatomik alt gruba ayrılır: dudak, ağız dili, ağız tabanı, sert damak, bukkal mukoza ve retromolar trigon (Şekil 2-4). Yakınlıklarına rağmen, bu alt bölgeler onkolojik tedavinin planlanmasında dikkate alınması gereken belirgin anatomik özelliklere sahiptir (19). Tüm oral kavite çok katlı yassı epitelle örtülüdür. Ağız tabanı ve dilin ventral kısmı atrofik ince mukoza ile kaplanmıştır.



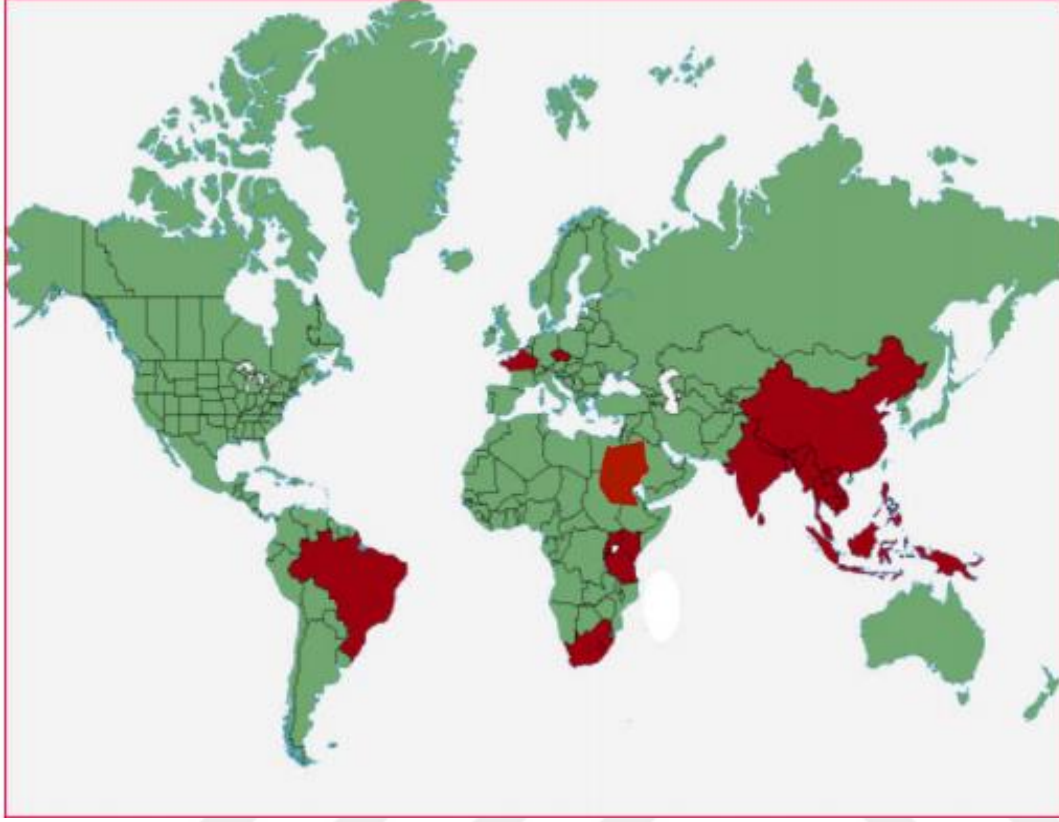
Şekil 2- 4. Oral kavitenin anatomik bölgeleri (19).

2.1.2. OSCC Epidemiyolojisi

OSCC kadınlarda 5., erkeklerde 8. en sık görülen kanser tipidir. Önleme ve tedavideki önemli gelişmelere rağmen tümörün kontrol edilememesi veya nüks sonucu tekrar ortaya çıkmasına ek olarak erken teşhis için uygun belirteçlerin bulunmaması sebebiyle tanı sonrası 5 yıllık sağkalım oranı düşüktür (4).

Gelişmekte olan ülkelerde OSCC insidansı yüksek oranda tespit edilirken, Dünya Sağlık Örgütü, önümüzdeki yıllarda dünya genelinde OSCC insidansının artacağını öngörmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 8.000 ölümden sorumlu olan malignitelerin %2-4'ünü oluşturmaktadır (3). Şekil 2-5'te belirtilen yüksek risk barındıran ülkelere Pakistan, Hindistan, Sri Lanka, ve Bangladeş'de OSCC, erkeklerde ilk sırada görülen bir kanser türü olup, kadınlarda 3. sırada bulunmaktadır. Avrupa ülkelerine bakıldığında en yüksek OSCC insidansına Fransa sahiptir. Fransa'yı takiben Macaristan, Slovenya ve Slovakya'da da yüksek oranlar bildirilmiştir (20). Almanya, İspanya, İsviçre, Portekiz ve İtalya'nın kuzey bölgelerinde ise, diğer Avrupa ülkelerine göre insidans oranları daha düşük bir ortalama sahip olup, Birleşik Krallık, Yunanistan, Finlandiya ve İsveç'te en düşük insidans oranları kaydedilmiştir.

Güney Amerika ve Karayiplerin genel ortalamasına bakıldığında OSCC erkeklerde beşinci sırada iken, kadınlarda altıncı sıradadır. Arjantin, Güney Brezilya ve Uruguay en yüksek oranlara sahip olurken en yüksek orana sahip ülke Brezilya'dır. Brezilya'daki erkek nüfusu, Fransa ve Hindistan'dan sonra dünyadaki en yüksek ağız kanseri riskine sahip nüfustur (21).



Şekil 2- 5. Oral kanser insidansı ve mortalitesi yüksek olan ülkeler (21).

Bazı durum ve genetik sendromlar da oral skuamöz hücreli karsinomun epidemiyolojik faktörlerindendir. Diyabet, organ transplantasyonu, fanconi anemi, kseroderma pigmentosum, diskeratozis konjenita ve diskoit lupus eritematozu gibi durumlara ek olarak Li Fraumeni sendromu, Plummer-Vinson sendromu gibi sendromlarında OSCC riskinin artması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (22).

2.1.3. OSCC Etiyolojisi

Oral kanserleri etkileyen birçok faktör mevcuttur. OSCC'nin etiyolojik faktörlerini sıralayacak olursak başta sigara olmakla beraber, alkol kullanımı, diyet (beslenme alışkanlığı), etnik köken, genetik köken, sosyo-ekonomik durum, viral etkenler (HPV, EBV, HIV), vitamin ve demir eksiklikleri, kötü ağız hijyeni, radyona maruz kalma sıklığı ve süresidir (23).

Tütün ve sigara kullanımı, gerek her yaştan kolay erişilebilmesi, gerekse yaygınlığı sonucu her yıl milyonlarca kanser ölümüne neden olmasından dolayı en önemli etiyolojik sebeptir (24). Tütün dumanındaki en önemli kanserojenler aromatik hidrokarbon ve nitrozamindir. Bu kanserojen

maddeler ve bunların metabolitleri keratinosit kök hücrelerinin DNA'sına bağlanır. DNA eklentilerini oluşturan keratinositler, DNA replikasyonundaki kritik mutasyonlardan sorumludur. Bu kanserojenlerin metabolizması, sitokromlarda P450 enzimleriyle oksitlenme ve glutatyon - S - transferaz (GST) ile konjugasyon oluşturarak hücreye hasar verme yeteneğine sahiptir (25). Sigara ve tütün kullanımının şekli katran, nikotin, nitrosamin içeriği ve yanma yöntemine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir (26). Kanser riskini arttırdığı bilinen betel yaprağı (Asya bölgesine özgü bir bitki) kullanılarak hazırlanan tütün çiğnenmesi ve yine bu bitki ile yapılan paan yemeğine ek olarak endüstri sigarasının da kullanımının yaygın olduğu Hindistan ve diğer Asya ülkelerinde, teşhisi konulan tüm kanser vakalarının %50'sini ağız kanseri oluşturmaktadır ve Güneydoğu Asya'da çoğu OSCC vakaları ağız boşluğunun bukkal ve damak bölgelerinde görülür (27).

Sigara kullanımından sonra gelen en önemli etiyolojik faktörlerden birisi alkol tüketimidir. Oral kavite üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda, yoğun alkol tüketiminin hem süre hem de tüketim miktarıyla, neoplastik bir etki oluşturma arasında doğrusal bir korelasyon göstermiştir (28). Dünya çapında, oral kanserlerin % 25'i tütün kullanımına, % 7-19'u alkol içmeye bağlıdır ve bu 2 faktör birlikte oral kanserlerin %75'ini oluştururlar (29). Alkollü içecekler N-nitrosodietilamin ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bazı kanserojen maddeler içerebilir. Etanolün oral mukoza üzerine doğrudan kanserojen etkiye sahip olmadığı düşünülürken, etanolün ilk metaboliti özelliğine sahip asetaldehitin kanserojen ve mutajenik bir madde olarak hücre hasarı, genotoksisite, mukozal morfolojiye etkisi nedeniyle karsinogenezde büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir (30).

HPV'ler zarfsız, küçük (52-55 nm), ikosahedral, protein kapsidi içerisine yerleştirilmiş 8.000 nükleotid baz çiftinin epiteliyopropik halkasal DNA virüsleridir ve oral kanserlerde HPV pozitifliği iyi prognozla ilişkili bulunmuştur (31). İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV)'nün OSCC'yi 2 kat etkilediğini bildiren çalışmalar mevcut olmakla beraber Epstein Barr Virüsü (EBV), insan herpes virüsü-8 (HHV-8) ve sitomegalovirüs de farklı çalışmalarda OSCC'nin risk faktörü olarak rapor edilmiştir (32).

Meyve ve sebze yemenin kanser riskini azalttığını bilinmekle birlikte Amerika ve İtalya'da yapılan çalışmalar akdeniz diyetinin kanser riskinin azalması ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Vitaminler, iz elementler, yağ asitleri, demir veya folit asit miktarının kanser riskini etkilediği bunların eksikliklerinde hastalığın ortaya çıktığı ortaya konulmuştur (33).

Epidemiyolojik çalışmalar ağız sağlığı durumunun ve ağız hijyeni uygulamalarının ağız kanseri gelişimi üzerindeki etkisine dair kanıt sağlamıştır. Kronik irritasyonlar, kötü ağız hijyeni, gargara, diş protezleri ve düzensiz diş fırçalama gibi durumlar oral SCC oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (34).

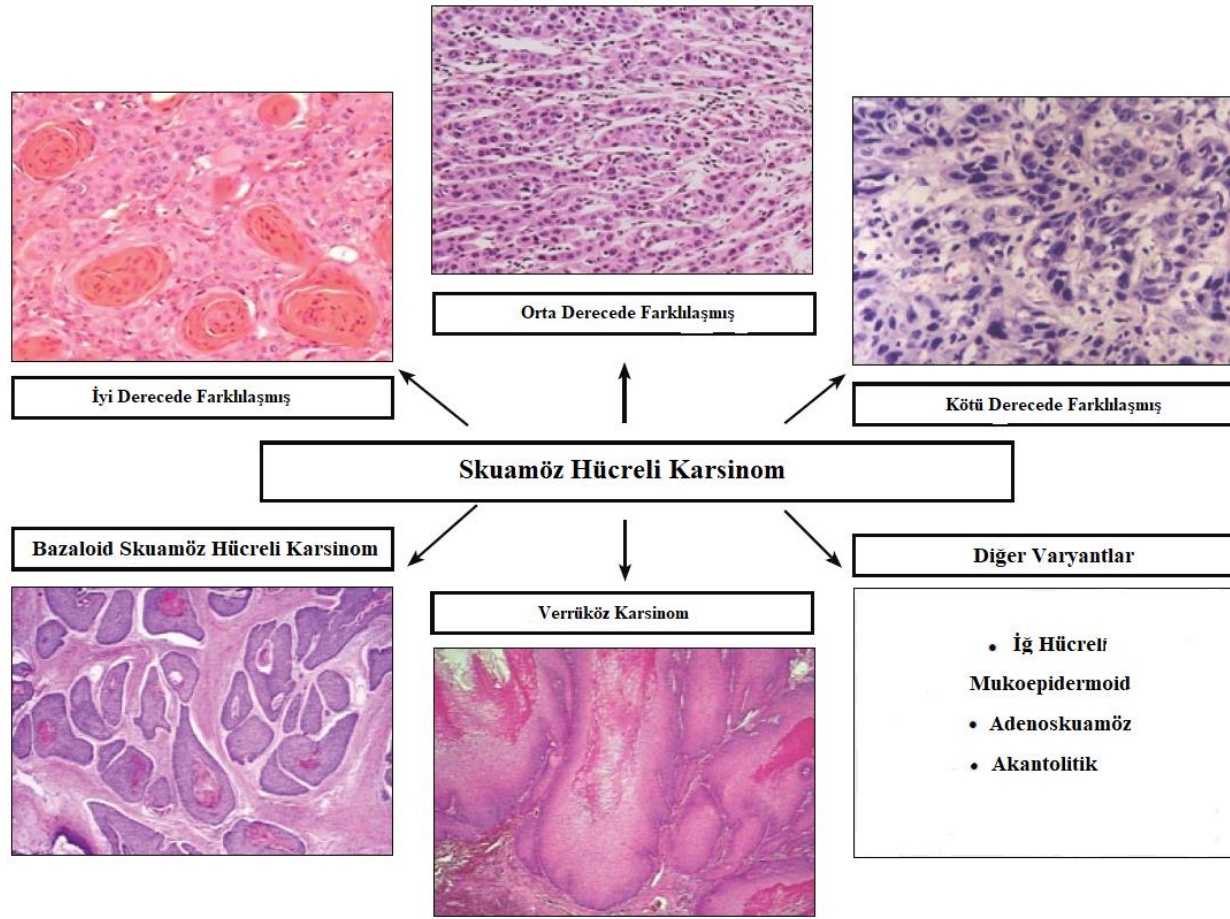
Son olarak immün sistemin yeterli çalışmaması da OSCC gelişiminde rol oynamaktadır. Tümör mikro çevresinde ve bağışıklık sisteminde meydana gelen değişimler, çeşitli kanserlerde olduğu gibi OSCC'de de kritik özellikleri belirler (35). Kemokinlerin ve bağışıklık hücrelerini aktive eden hipoksi regülatör genlerinin beraber aktive olması tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışına neden olmaktadır. Ayrıca OSCC'nin gelişimi, immün efektör hücrelerinin ve regülatör T hücrelerinin frekansına ek olarak dolaşım içerisinde bulunan ve aynı zamanda tümör sızdıran T hücrelerinin fonksiyonel durumuna bağlı olarak hücrelerin apoptozdan kaçma mekanizması immün sistemi ile desteklenmektedir (36).

2.1.4. OSCC Histopatolojisi

Oral kanserlerin sınıflandırılmasını yansıtan Tablo 2-3'de bulunan epidermoid karsinomlar tüm oral kanserlerin %90'ını kapsayarak, oral kavite kanserleri içerisinde en sık görülme oranına sahiptir ve % 5-10'unu oluşturan minör tükürük bezi karsinomları (adenokistik karsinoma, adenokarsinoma, mukoepidermoid karsinoma) ile geri kalan kısmını ise malin melanom, metastatik tümörler, yumuşak doku sarkomları, multipl miyelom, Hodgkin dışı lenfomalar oluşturur (37). Ayrıca her bir alt grup kendi içerisinde Şekil 2.6'da gösterildiği gibi farklı bir farklılaşma özelliği içerirler (38).

Tablo 2- 1. Oral Kanserlerin Sınıflandırılması (37).

Oral Kanserler	Alt Gruplar
Epidermoid Karsinom	Skuamöz Hücreli Karsinom Verrüköz Karsinom Bazaloid Karsinom Adenoskuamöz Hücreli Karsinom Spindle Hücreli Karsinom Bazoskuamöz Karsinom
Tükürük Bezi Karsinomları	Adenokarsinom Polimorfoz düşük gradlı Mukoepidermoid karsinom
Lenfomalar	Hodgkin Lenfomalar Hodgkin Dışı Lenfomalar Burkitt Lenfoma
Sarkomlar	Osteosarkom Fibrosarkom Liposarkom Kondrosarkom Fibröz histiyositom Rhabdomiyosarkom Nörofibrosarkom Kaposi sarkomu Anjiyosarkom
Melanomlar	Malin melanom
Multipl Miyelom	
Metastatik Tümörler	



Şekil 2- 6. Oral kavite kanserlerinin histopatolojik alt tipleri (38).

Skuamöz Hücreli Karsinom; Bu karsinom tipi bir epidermoid karsinom özelliği göstermekle birlikte bu gruba verrüköz karsinom, bazaloid karsinom, adenoskuamöz hücreli karsinom, asinik hücreli karsinom, ve bazoskuamöz hücreli karsinom da dahildir (37).

Verrüköz Karsinom; Oral verrüköz karsinom (OVC), ağız boşluğunda en sık görülen, OSCC varyantıdır. Bu lezyon için kesin bir etyoloji bulunmasa da insan papilloma virüsü, tütün kullanımı ve radyasyona maruz kalma nedenler olarak önerilmektedir. OVC’ler yavaş büyüme ve metastaz özelliklerinin güçlü olmasa da büyük bir lezyon haline ulaştığı zaman komşu hücreleri yok edebilme özelliğine sahiptir. En sık oral mukozal tutulum bölgelerinin bukkal mukoza, dil ve diş eti olduğu bildirilmiştir. VC pleomorfizm gösteren, yüksek düzeyde epitel farklılaşma özelliğine sahip ve histolojik olarak displastik parakeratotik epitelden oluşmaktadır (39).

Bazaloid Karsinom; Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bazaloid skuamöz hücreli karsinom (BSCC), hem bazaloid hem de skuamöz bileşenlerden oluşan yüksek dereceli, agresif bir skuamöz hücreli karsinom (SCC) çeşididir. Genellikle baş boyun bölgelerinde oluşan bu karsinom tipleri bu bölge dışında daha az yaygın olan oral mukoza, bademcikler, ağız tabanı, damak, nazofarinks, sinonazal sistem ve trakeada görülebilmektedir. Bazaloid SCC, genellikle yaşlı erkek bireylerde ortaya çıkan bir tümör tipi olarak kabul edilir (40).

Adenoskuamöz Hücreli Karsinom; Adenoskuamöz karsinom, ağız boşluğunda nadir görülen bir skuamöz hücreli karsinom çeşitidir ve histolojik olarak, birleşik glandüler ve skuamöz yapıların varlığı ile karakterize edilir. Baş ve boyun bölgesinde paranazal sinüs, gırtlak ve ağız boşluğu adenoskuamöz karsinomun en sık görüldüğü yerlerdir (41).

İğ Hücreli Karsinom; İğ hücreli karsinom son zamanlarda klasik skuamöz hücreli karsinomun monoklonal defferentize formu olarak tanımlanmaktadır (42).

Adenokarsinom; Genellikle güneşe maruz kalan deri üzerinde görülür ve ağızda nadir fakat iyi bilinen bir skuamöz hücreli karsinom varyantıdır. Histolojik olarak lezyon, adenoid patern oluşturan atipik epitel hücrelerinin yanı sıra geleneksel skuamöz hücreli karsinomun alanlarını gösterir (43).

Mukoepidermoid Karsinom; Mukoepidermoid karsinom (MEC) en sık görülen tükürük bezi malinitesidir. En sık parotis bezi içinde ve bunu takiben ağız boşluğu (OC), orofarinks (OP) içindeki minör tükürük bezleri bulunur. Parotis bezinin mukoepidermoid karsinomunda prognostik faktörler, klinikopatolojik özellikler ve onkolojik sonuçlar iyi tanımlanmıştır (44).

2.1.5. OSCC Belirtileri

Oral SCC, sekonder biçimde enfekte olmadıkça genellikle ağrısızdır, fakat büyük lezyonlar normal konuşma, çiğneme veya yutmayı engelleyebilir. Oral SCC klinik olarak farklı biçimlerde görülebilir ve verrucous lökoplaki, lökoplaki, eritrolökoplaki veya eritroplaki'ye benzetilebilir. Bu lezyonlar genellikle lökoplaki ve eritroplaki olarak bilinen beyaz veya kırmızı lekeler olarak ortaya çıkar. Bu lezyonların herhangi biri nekrotik görünümlü, düzensiz, sivri uçlu kenarları olan bir ülser ya da yüzeyi pürüzsüz olan geniş bir bazal ekofiyotik kitle şeklinde olabilir (45).

Kanser ilerledikçe, hasta iyileşmeyen bir ülser olduğunu fark edebilir ve ilk evrelerde ağrı yapmayan bu yapı sonraki aşamada kanama, takma dişlerde zorluk, diş gevşemesi, disartri, disfaji,

odinofaji şeklinde semptomlar oluşturabilir. Yapılan çalışmalar prekanseröz yapıda olan oral liken planusun, özellikle de aşındırıcı formun, artmış kanser riski ile ilişkili olduğunu öne sürülmüştür (46). Dil bölgesinde oluşan karsinomda dil-diş etkileşimi sonucu daha fazla rahatsızlık verdiği gözlenirken, buna karşılık, dudak ve bukkal mukozada ortaya çıkan karsinomlar sadece ileri evrelerde yüksek ağrı gösterir (47).

Oral lezyonların başlangıçta asemptomatik olması oral taramaya duyulan ihtiyacı vurgulayarak, çoğu diş uzmanı, hastanın rutin bakımı sırasında ağız boşluğu ve oroferinks'i dikkatle inceleyerek ve anormal alanların fırça biyopsisini yapabilir. Bu oral lezyonların belirlenmesi;

- Biyopsi
- İkinci primer kanseri saptayan endoskopi
- Göğüs röntgeni ve baş- boyun BT'si ile yapılmaktadır.

Biyopsi cerrahın tercihine göre insizyonel veya fırça biyopsisi şeklinde yapılabilir. OSCC tanısı konulan tüm hastalara eş zamanlı olarak ,varsa ikinci bir primer kanser tespiti için, başka bir laringoskopi ve özofagoskopi yapılır. Akciğer grafisi ve bununla birlikte, baş-boyun bölgelerinin çoğunda kullanıldığı gibi, PET / BT, ağız boşluğu kanserli hastaların tanı ve teşhisinde daha büyük bir rol oynamaya başlamıştır (48).

2.1.6. OSCC Prognostik Faktörler

Oral SCC dünya çapında yüksek bir insidansa ve oldukça sıkıntılı bir prognoza sahiptir ve bu da hastalığın seyrini ve sonucunu değiştirebilecek alternatif faktörler için daha fazla araştırma yapılmasını teşkil etmektedir (2). OSCC için prognostik faktörler Tablo 2-4'te özetlenmiştir (49).

Tablo 2- 2. Oral skuamöz hücreli karsinomun prognostik faktörleri (49)

Faktörler	Parametreler
Hasta	Yaş, cinsiyet, ırk, sigara kullanımı, alkol tüketimi, beslenme alışkanlığı, sosyo-ekonomik durum, geç teşhis, kalp-damar ve kanser hastalık geçmişi
Tümör	Tümör boyutu, kalınlığı, hacmi ve tümör bölgesi marjin durumu, anatomik tutulum bölgesi
Histopatolojisi	Malinite derecesi, invazyon şekli, perivasküler invazyon perinöral invazyon,
Lenf bezi metastazları	Metastatik lenf nodu sayısı, ekstrakapsüler ekstasyon, nodül boyutu
Moleküler faktörler	COX-2, P53, anjigeniz düzenleyici faktörleri, p16, p21, Rb, Cyclin D1, EGFR, TGF, HPV

2.1.7. OSCC Evreleme

En erken evre ağız boşluğu veya orofaringeal kanserler evre 0 (yerinde karsinom) olarak adlandırılır ve daha sonra evre I (1) ile IV (4) arasında değişir. Kural olarak, sayı ne kadar düşük olursa, kanser o kadar az yayılır. Evre IV gibi daha yüksek bir sayı, kanserin daha fazla yayıldığı anlamına gelir. Her birinin kanser deneyimi benzersiz olmasına rağmen, benzer evrelere sahip kanserler benzer bir görünüme sahip olma eğilimindedir ve çoğu kez aynı şekilde tedavi edilir.

Ağız boşluğu veya orofaringeal kanserler için en sık kullanılan evreleme sistemi, 3 ana bilgiye dayanan Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) TNM sistemidir:

Tümörün kapsamı (T): Ana (primer) tümörün büyüklüğüne, eğer varsa ağız boşluğu veya orofarinks dokularındaki yayılma durumuna göre belirlenir.

Yakındaki lenf düğümlerine yayılma (N): Kanser, yakındaki lenf düğümlerine yayılmasına göre belirlenir.

Uzak bölgelere yayılma (metastaz) (M): Kanser, akciğer gibi uzak organlara yayılıp yayılmadığına göre belirlenmektedir.

Tablo 2-5.'te ve Tablo 2-6'te Amerikan Kanser Topluluğu'na göre oral kavitenin p16 pozitif-negatiflik durumuna göre evreleme özetlenmiştir (49).

Tablo 2- 3. p16 negatif durumuna göre evrelendirme (49).

AJCC Evresi	Evre gruplandırma.	Dudak, ağız boşluğu ve p16 negatif orofarinks evresi açıklaması*
0	Tis	Kanser hala epitelde (ağız boşluğu ve orofarinks kaplayan hücrelerin üst tabakası) ve henüz daha derin tabakalara dönüşmemiştir.
	N0	
	M0	Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmadı. Bu aşama aynı zamanda in situ karsinom olarak da bilinir (Tis).
I	T1	Kanser 2 cm (yaklaşık ¾ inç) veya daha küçüktür. Yakındaki dokulara dönüşmemekte (T1). Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılma göstermemektedir.
	N0	
	M0	
II	T2	Kanser 2 cm'den büyük fakat 4 cm'den (yaklaşık 1½ inç) büyük değil. Yakındaki dokulara dönüşmüyor (T2). Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmamaktadır.
	N0	
	M0	
III	T3	Kanser 4 cm'den daha büyük (T3). Orofarenks kanserleri için, T3 ayrıca epiglotta (dilin tabanı) büyüyen tümörleri içerir. Yakındaki lenf düğümlerine (N0) veya uzak bölgelere (M0) yayılmadı.
	N0	
	M0	
	VEYA	
	T1, T2, T3	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakınlarda büyümüş olabilir.
	N1	Orofarenks kanseri (T1-T3) VE primer tümörle aynı tarafta 1 lenf düğümüne yayılmışsa yapılar. Kanser, lenf düğümü dışında büyümemiştir ve lenf düğümü 3 cm'den (yaklaşık 1¼ inç) (N1) büyük değildir. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	M0	

IVA	T4a N0 veya N1 M0	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakındaki yapılara dönüşmektedir: • Dudak kanserleri için: yakındaki kemik, alt alveoler sinir (çene kemiğine sinir), ağzın tabanı veya çene veya burunun derisi (T4a) • Ağız boşluğu kanserleri için: çene veya yüz kemikleri, dilin derin kası, yüz derisi veya maksiller sinüs (T4a) • Orofaringeal kanserler için gırtlak (ses kutusu), dil kası veya medial pterygoid, sert damak veya çene gibi kemikler (T4a). Bu orta derecede ileri derecede lokal hastalık olarak bilinir (T4a). VE aşağıdakilerden herhangi biri: • Yakındaki lenf düğümlerine yayılmadı (N0)) • tümör, ancak lenf düğümü dışında büyümemiş ve lenf düğümü 3 cm'den (yaklaşık 1¼ inç) (N1) daha büyük değil. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	VEYA	
IVB	T1, T2, T3 veya T4a N2 M0	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakınlarda büyümüş olabilir. yapılar (T0-T4a). Uzak organlara yayılmadı (M0). Aşağıdakilerden birine yayılmış olup: • Birincil tümörle aynı tarafta 1 lenf düğümü, ancak lenf düğümü dışında büyümemiş ve lenf düğümü 3 cm'den büyük fakat 6 cm'den (yaklaşık 2½ inç) büyük olmamıştır (N2a) VEYA: • Primer tümörle aynı tarafta 1'den fazla lenf düğümüne yayıldı, ancak lenf bezlerinin hiçbirisi dışında büyümemiş ve hiçbirisi 6 cm'den büyük olmamıştır (N2b) VEYA • Primer tümörün karşı tarafında veya boynun her iki tarafında 1 veya daha fazla lenf düğümüne yayılmış, ancak lenf bezlerinin hiçbirisi dışında büyümemiş ve hiçbirisi 6 cm'den (N2c) daha büyük değildir.
	Herhangi T N3 M0	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakındaki yumuşak dokulara veya yapılara (Herhangi Bir T) VE aşağıdakilerden herhangi birine dönüşmüş olabilir: • 6 cm'den büyük ancak lenf düğümü dışında büyümeyen 1 lenf düğümüne yayılmış (N3a) VEYA • 3 cm'den daha büyük olan ve lenf düğümü (N3b) dışında açıkça büyümüş olan 1 lenf düğümüne yayılmıştır. VEYA • Aynı tarafta, karşı tarafta veya birincil kanserin her iki tarafında, lenf düğümü (lerinin) dışında büyümesi ile birlikte 1'den fazla lenf düğümüne yayılmıştır (N3b) VEYA • Primer kanserin karşı tarafında 3 cm veya daha küçük olan ve lenf bezinin (N3b) dışında gelişen 1 lenf düğümüne yayıldı. Uzak organlara yayılmadı (M0).
	VEYA	

	T4b Herhangi N M0	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakındaki yapılara dönüşmektedir. kafatasının tabanı veya yakındaki diğer kemikler gibi veya karotis arteri çevreler. Bu çok ileri lokal hastalık olarak bilinir (T4b). Yakındaki lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). Uzak organlara yayılmadı (M0).
IVC	Herhangi T Herhangi N M1	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakındaki yumuşak dokulara veya yapılara dönüşmüş olabilir (Herhangi Bir T) VE yakındaki lenf düğümlerine (Herhangi Bir N) yayılmış olabilir veya olmayabilir. Akciğerler gibi uzak bölgelere yayılmıştır (M1).

* Aşağıdaki ek kategoriler yukarıdaki tabloda açıklanmamıştır:

- **TX:** Ana tümör bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor..
- **T0:** Bir primer tümör kanıtı yok
- **NX:** Bölgesel lenf bezleri bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor.

Tablo 2- 4. p16 pozitif durumuna göre evrelendirme (50).

AJCC Evresi	Evre gruplandırma.	Dudak, ağız boşluğu ve p16 pozitif orofarinks evresi açıklaması*
I	T0, T1 veya T2 N0 veya N1 M0	Kanser 4 cm'den (yaklaşık 1 1/2 inç) daha büyük değildir (T0 ila T2) VE aşağıdakilerden herhangi biri: • Yakındaki lenf düğümlerine yayılmadı (N0) VEYA • Primary Primer kanserle aynı tarafta 1 veya daha fazla lenf bezine yayıldı ve hiçbirisi 6 cm'den (N1) büyük değil. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
II	T0, T1 veya T2 N2 M0	Kanser 4 cm'den (yaklaşık 1 1/2 inç) (T0 ila T2) daha büyük değildir ve birincil kanserin karşı tarafında veya boynun her iki tarafında 1 veya daha fazla lenf düğümüne yayılmıştır ve hiçbirisi daha büyük değildir 6 cm'den (N2). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
	VEYA T3 veya T4 N0 veya N1 M0	Kanser 4 cm'den büyük (yaklaşık 1 1/2 inç) (T3) VEYA epiglotta (dilin tabanı) (T3) büyümek VEYA larinks (ses kutusu), dil kası veya medial pterygoid plaka, sert damak veya çene (T4) gibi kemiklerde büyüyorsa ve aşağıdan: • Yakındaki lenf düğümlerine yayılmadı (N0) VEYA • Primer kanserle aynı tarafta 1 veya daha fazla lenf düğümüne yayıldı ve hiçbirisi 6 cm'den büyük değil (N1). Uzak bölgelere yayılmadı (M0).

III	T3 veya T4 N2 M0	Kanser 4 cm'den büyük (yaklaşık 1 1/2 inç) (T3) VEYA epiglotta (dilin tabanı) (T3) büyümek VEYA larinks (ses kutusu), dil kası veya medial pterygoid plaka, sert damak veya çene (T4) gibi kemiklerde büyür VE primer kanserin karşı tarafında veya boynun her iki tarafında 1 veya daha fazla lenf düğümüne yayılmış ve hiçbiri 6 cm'den (N2) büyük değildir. Uzak bölgelere yayılmadı (M0).
IV	Herhangi T Herhangi N	Kanser herhangi bir boyuttadır ve yakınlarda büyümüş olabilir. yapılar (Herhangi bir T) VE yakındaki lenf düğümlerine yayılmış olabilir veya olmayabilir (Herhangi bir N). Akciğerler veya kemikler gibi uzak bölgelere yayılmıştır (M1).
	M1	

* Aşağıdaki ek kategoriler yukarıdaki tabloda açıklanmamıştır:

TX: Ana tümör bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor..

T0: Bir primer tümör kanıtı yok

NX: Bölgesel lenf bezleri bilgi eksikliği nedeniyle değerlendirilemiyor.

2.1.8. OSCC'nin Önlenmesi ve Kontrolü

Sigara, alkol tüketimini azaltmak, sağlıklı beslenme ve gerekli ise vitamin takviyeleri almak, stresten uzak durmak, ağız sağlığına önem verilmesi ve rutin olarak diş hekimi kontrolüne gidilmesi gibi etiyolojik faktörleri azaltmak bu kanser için alınacak önlemler arasındadır (50). HPV-16 ile ilişkilendirilen OSCC için geliştirilen aşılarda OSCC insidansına olan etkisi için kesin bir şey söylemek için erken olmasına rağmen, önlem için kullanılabilmektedir (51). Malin veya premalin dokunun erken teşhisi ve erken tedavi başlangıcı ya da temel olarak kemoterapi ve radyoterapinin yanı sıra tümör kitlesinin cerrahi olarak çıkarılmasını ve ardından morbiditeyi azaltmak için palyatif bakım ve post-operatif takibi yapılabilir (52).

2.1.9. OSCC Tedavisi

Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi en sık kullanılan tedavi yöntemleridir. Tedavi yönteminin barındırdığı potansiyel yan etkiler sebebiyle, tedavi biçimleri hakkında hastalar da karar vermeye dahil edilmelidir (53). Erken evre oral skuamöz hücreli karsinomlu hastalar için ilk olarak cerrahi tedavi önerilse de maalesef çoğu vakada hastada rezeksiyonu engelleyen, lokal olarak ilerlemiş bir durum söz konusudur. Primer tümörün rezeksiyonundan sonra, oral fonksiyonu ve kozmetik görünümü geri almak için genellikle rekonstrüktif cerrahi gerekir. Kemoterapi ve radyasyonun birlikte kullanımı, lokal olarak ilerlemiş ağız kanserlerinin tedavisinde birincil terapi olarak kapsamlı bir şekilde kullanıldığı gibi hem de organ korunmasını sağlamaktadır (54).

OSCC tedavisi için moleküler yaklaşım için seçilen etkili hedeflerden birisi mTOR-Rapamisin'dir. Buna ek olarak yapılan çalışmalar HPV-EMT birlikleri tedavi ve prognostik değerlendirme için de kullanılabildiğini savunmuşlardır (55).

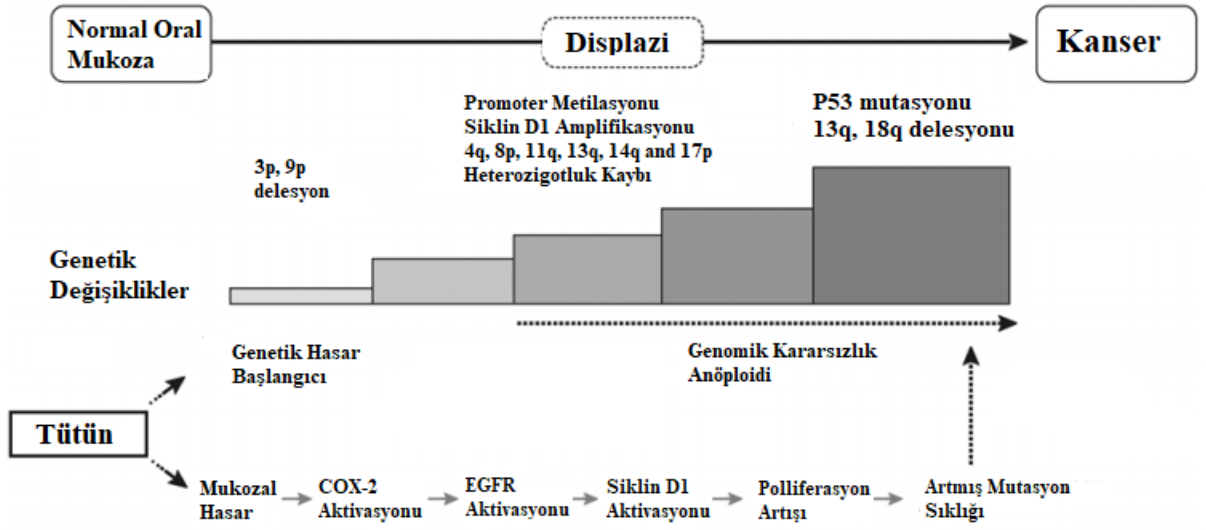
İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin baş-boyun kanserinin tedavisine dahil edilmesi, programlanmış hücre ölümü proteini 1'in (PD-1) ve bunun ligandının (PD-L1) ilgilenilen ana yollardan birinin eşzamanlı olması olarak araştırılmıştır. PD-1, PD-L2'ye bağlanması ve T-hücre proliferasyonunu inhibe ederek, anti-apoptotik molekül Bcl-xL, sitokin ekspresyonu ve mTOR yolunun ekspresyonunu bağışıklık hücrelerinde düzenlemesinde rol alabilen bir ko-inhibitör reseptördür. Halen, klinik denemelerde metastatik/tekrarlayan baş-boyun kanserinde sağkalım yararına ilişkin erken ümit verici

sonuçlar sunan birkaç anti-PD-1 ve anti-PD-L1 monoklonal antikoru vardır. Bundan dolayı hastaları tedavi ederken standart Cetux'a immünoterapötikler eklenir (56).

Son olarak, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (*EGFR*) aşırı ekspresyonunun oral SCC'de doğrulanması ve zayıf bir prognozla ilişkili olduğunun bildirilmesi üzerine monoklonal bir antikorun *EGFR* inhibitörü gibi hedeflenmiş bir ajanla birleştirilerek uygulanmasının, primer radyoterapiye göre sağ kalım süresini arttırdığı bildirilmiştir. Son zamanlarda, bir *EGFR* inhibitörü özelliği gösteren cetuximab post-operatif radyoterapiye eklenmesinin oral kanser hastalarında genel sağkalım ömrünü uzatıp uzatmayacağını değerlendirmek için RTOG 0920 denemesi başlatılmıştır (57).

2.1.10. OSCC'nin Moleküler Biyolojisi

OSCC'nin oluşumunda hem genetik hem de epigenetik değişiklikler söz konusudur. *p53* tümör baskılayıcı gen, insan kanserlerinde en sık değişime uğrayan gen olup bu durum OSCC için de geçerlidir. Yapılan araştırmalar yaş ve *p53* durumunun OSCC oluşumunda korelasyon gösterdiğini yansıtmaktadır. Sigara kullanımı, alkol tüketimi gibi etiyolojik faktörler de *p53* geninin DNA'sına hasar vererek hücrenin tamir mekanizmasını etkilemektedir (58). Aşırı *Siklin D1* (*CCND1*) ekspresyonu, oral skuamöz displazi vakalarının % 40'ında tarif edilmiştir. Genel olarak 9p, 3p ve 17p'deki kromozomal materyalin kaybı displastik lezyonlarda gözlenerek oral karsinogenezin erken belirteçleri olduğunu gösterir. 13q ve 8p'de meydana gelen kayıplar karsinomlarda displaziye oranda daha fazla görülür ve bu olay sonraki karsinogenez aşamalarıyla ilişkilidir. Ağız kanserinin moleküler patogenezinde rol oynayan önemli moleküllerin etkisi Şekil 2-7'de ve bu karsinogenezde en sık değişim meydana gelen bölgeler ile değişim oranları Tablo 2-7'de gösterilmiştir. Normal epitelinin birçok genetik değişiklikler yolula transformasyona uğraması displaziye ve invaziv karsinomlara yol açar. Oral karsinogenezde meydana gelen akümülatif genetik değişiklikler, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (*EGFR*) aktivasyonunu, tümör baskılayıcı olan *p53* ve *p16*'yı değiştirdiğini ve siklin D1'in aşırı ekspresyonunu oluşturur. (59).



Şekil 2-7. Oral karsinogenezin genetik progresyon modeli (52).

HPV pozitifliği oral kanserlerde iyi prognozla ilişkili bulunarak HPV ile enfekte olan tümör hücrelerinin radyo-sensivitesinin daha yüksek olduğu ve bundan dolayı daha iyi bir sağkalım gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir (60).

Tablo 2- 5. Oral skuamöz hücreli karsinomda sık görülen moleküler anormallikler (53).

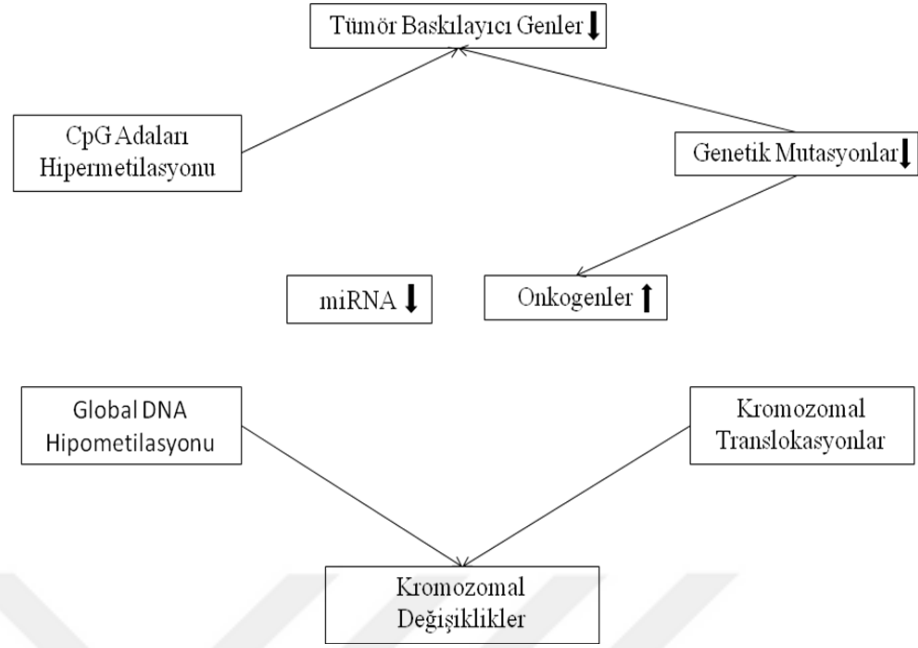
Meydana Gelen Değişiklik	Yüzdesi
LOH 9p	%70–80
LOH 3p	%60–70
LOH 17p	%50–70
LOH 11p	%30
LOH 13p	%30
P16 ^{ink4A} 'nın etkisiz hale getirilmesi (homozigot silme, promotör metilasyonu, nokta mutasyonu)	%80
FHIT ve RASSF1A p53 mutasyonunun etkisizleştirilmesi	%50–80
Cyclin D1 amplifikasyonu	%30

DNA iplikçiklerine heksanükleotid tekrarları ekleyen telomerazlar, kromozomal uzunluğu koruyan enzimlerdir. Bazı bulgular telomeraz aktivitesindeki artışın skuamöz hücreli karsinomun ilerlemesinde daha erken oluştuğunu göstermektedir. DNA

hipermetilasyonu ise ise, CpG bakımından zengin olan bölgelerde DNA promotöründe meydana gelen hipermetilasyon sonucu gen ekspresyonunun susturulmasına neden olan ve dolayısıyla kanser oluşumunu baskılayan genleri de etkileyen epigenetik değişikliklerdir. Ağız boşluğunda meydana gelen displazik lezyonlarda, 9p21 kromozomunda *p16^{INK4a}* lokusunun hipermetilasyonu sıklıkla gözlenmiştir (61).

2.2. Epigenetik

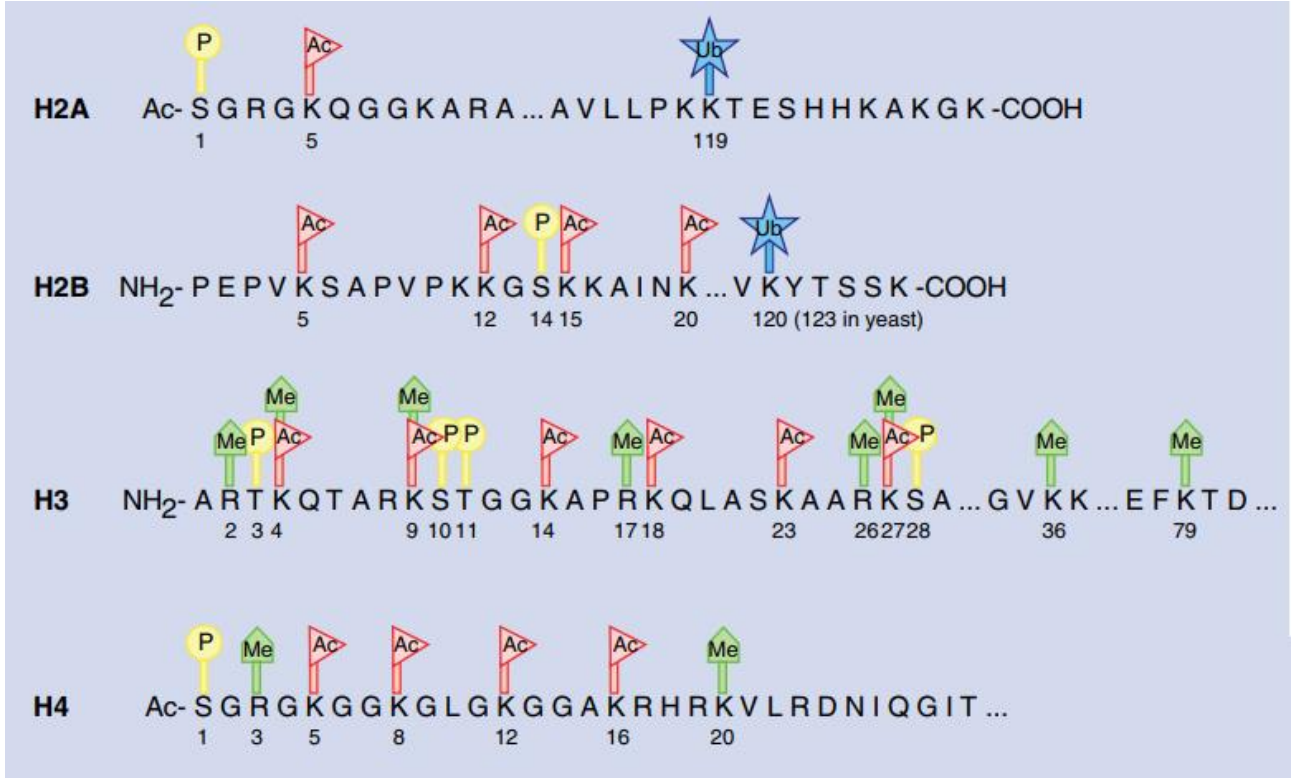
Genetik değişiklikler tek başına bir popülasyondaki fenotip çeşitliliğini açıklayamadığı gibi aynı DNA dizisine sahip olan, monozigotik ikizlerin veya klonlanmış hayvanların farklı fenotiplere ve bir hastalığa karşı farklı duyarlılıklarına nasıl sahip olabileceğini de açıklayamamaktadır. Epigenetik kavramı, gen dizisindeki DNA dizisindeki herhangi bir değişiklikten kaynaklanmayan kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanarak kromatin yapısı ve gen fonksiyonunun ürünler üzerindeki etkisini anlamayı içerir (62). Tümör hücresi, normal hücreden farklı olarak sınırsız proliferasyon, immün sistemden ve apoptoz sinyallerinden kaçış gibi özellikler barındırarak kontrolsüz ve sürekli hücre büyümesine yol açar (63). Kanserde hücrede uzun bir süreç içerisinde genetik ve/veya epigenetik mekanizmalarda meydana gelen hasarların birikimi kanser oluşumunda ve gelişiminde rol oynamaktadır (64). Hücrede meydana gelen mutasyon, genetik kararsızlık gibi genetik değişiklikler sonucunda meydana gelen değişiklikler genlerin fonksiyon kazancına veya kaybına yol açarak epigenetik değişikliklere de neden olabilmektedir (65). Epigenetik mekanizmalardaki bozulmalar, tümör baskılayıcı genlerin bağımsız olarak susturulmasına yol açabilir ve bunun yanı sıra, onkogenleri aktive ederek tümörigenezi de başlatabilir (66). DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi ve miRNA regülasyonu epigenetik mekanizmaları oluşturmaktadır (67).



Şekil 2- 8. Kansere yol açan genetik ve epigenetik mekanizmalar.

2.2.1. Histon Modifikasyonları

Hücreler içindeki DNA, temel yapı taşları olarak nükleozomlardan oluşan dinamik bir yapı olan kromatin olarak paketlenir. Histonlar, nükleozomal alt birimin merkezi bileşenidir ve dört çekirdekli histon proteinini (H3, H4, H2A, H2B) içeren ve etrafına bir 147-baz-çifti DNA parçası sarılmış bir oktamer oluşturur. Büyük ölçüde küresel histon proteinlerinin her biri, bazik lisin ve arginin kalıntıları ile yoğun şekilde doldurulmuş olan karakteristik bir yan zincire veya kuyruğa sahiptir (68). Histonların N-terminalleri, nükleozom çekirdeğinden dışarı çıkarlar ve N-terminallerinin amino asitleri metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, çoğaltma ve toplanma gibi bir dizi kovalent modifikasyondan kolayca geçer (69). Histon modifikasyonları hücredeki DNA onarımlarını, transkripsiyonel aktiviteyi ve buna bağlı genlerin susturulmasında rol oynamaktadır (70).



Şekil 2- 9. Çekirdek histonların translasyon sonrası modifikasyonları (71).

Şekil 2-9’da görüldüğü üzere renkli şekiller, çekirdek histonların dönüşüm sonrası değişikliklerini temsil eder. Histon kuyukları lisinlerde ve argininlerde (yeşil beşgenlerde) metillenebilir, serinlerde veya treoninlerde fosforile edilebilir (sarı daireler), ubikile edilmiş (mavi yıldızlar) ve lisinlerde asetillenmiş (kırmızı üçgenler) olabilir (71).

Histon modifikasyonları üzerine yapılan çalışmalar, hücresel süreçleri kontrol eden epigenetik mekanizmaların anlaşılmasını geliştirmiştir. Dahası, histon izlerinin desenleri kanser hücrelerinde derinden değişmiş halde bulunmaktadır. Histonları düzenleyen kompleksler ve histon izlerini içeren epigenetik düzensizlik, hastalığın gelişmesinin ve ilerlemesinin altında yatan önemli bir mekanizmadır. Bu mekanizmalar, gen transkripsiyonunun serbest bırakılması ve DNA onarımı yoluyla onkogeneze katkıda bulunabilir. Ayrıca, yapılan çalışmalar kanserin farklı tiplerinin ve alt tiplerinin, biyobelirteç keşfinde yararlanılabilecek spesifik histon modifikasyon modellerine (histon modifikasyon imzaları) sahip olabileceğini savunmaktadır. Son olarak, histon modifikasyonları geri dönüşümlü olduğundan, kanser tedavisi ve önlenmesi için potansiyel hedefleri temsil ederler (72).

Histon modifikasyonlarının kanserdeki rolüyle ilgili ilk çalışmalar, neredeyse tüm insan kanser tiplerinde bir belirteç görevi gören küresel H4K16ac ve H4K20me3'ün global değişikliklerinin araştırılmasıyla başlamıştır. Fakat bunun yanı sıra, diğer post translasyonel modifikasyonlar (PTM)'da meydana gelen değişiklikler tümörler için daha özgü olabilir. Örneğin, meme kanseri hücreleri düşük H3K4me2 ve H3K9ac seviyelerini gösterirken, akciğer kanseri hücreleri düşük H3K4me2 fakat yüksek H3K9ac seviyelerini gösterir (73). Literatürde belirtilen çalışmalara göre DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasındaki bağlantının -metil CpG bağlayıcı protein 2 (MeCP2), Metil-CpG bağlayıcı bölge proteini 1 (MBD1) ve Kaiso (ZBTB 33 olarak da bilinir) dahil olmak üzere- metil DNA bağlama aktivitesine sahip bir protein grubunun aracılık ettiğini göstermiştir. Bu proteinler, DNA metillenmiş promotörlere lokalize olarak histon deasetilazlar (HDAC'ler) ve histon metil transferazlar içeren bir protein kompleksi oluşturur. Bu çalışmalar, DNA metilasyonunun, histon modifikasyonlarının değiştirilmesi yoluyla kromatin yapısal değişiklikleri indüklediğini gösterir. DNA metilasyonunun H3K4me'yi inhibe ettiği, bunun da DNA metilasyonunun histon modifikasyonlarını etkilediğinin kanıtı olduğu bilinmektedir (74). H3K9ac'ın azalması, prostat ve over tümörlerinde histolojik derecelendirme, tümör ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (75). H3K4me1 ve H3K27me3 karaciğer kanseri hücrelerde daha zengin bir şekilde bulunmakta olup, burada meydana gelen değişikliklerin bu kanserle ilişkili epigenetik mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesinde rol oynayacağını belirtmektedir (76).

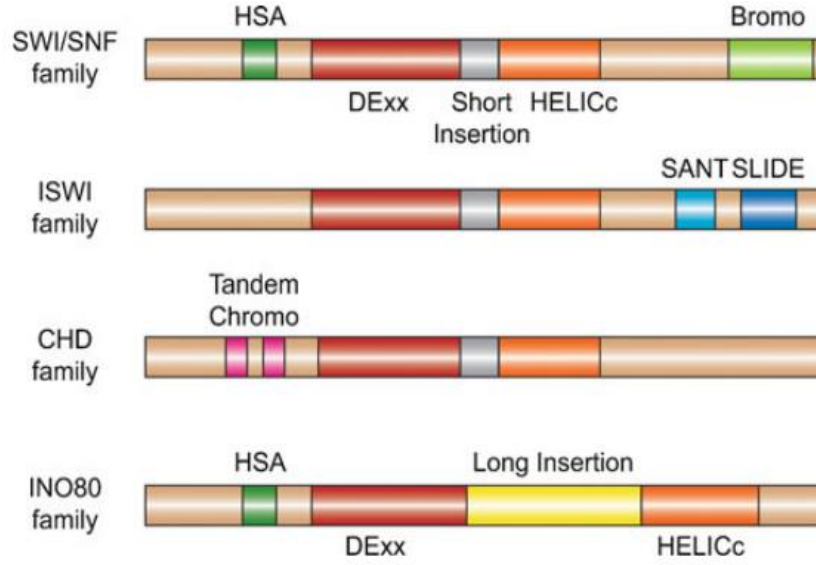
2.2.2. miRNA Regülasyonu

MikroRNA'lar (miRNA'lar), kodlama yapmayan, endojen ve hücre protein ekspresyonunu sağlayan mekanizmaların kontrolünde anahtar rol oynayan küçük RNA'lardır (77). Bir kez bir ribonükleoprotein kompleksi miRISC'ye alındıktan ve bir kez dahil edildiklerinde, bir miRNA sekansına bağlı işlemde spesifik mRNA'ları hedefleyebilir ve birkaç mekanizma aracılığıyla hedeflenen mRNA'ların proteinlerine dönüşümüne müdahale edebilirler. Sonuç olarak, miRNA'lar birçok hücre yolunu ve işlemini düzenleyebilir. Özellikle, kanserde miRNA'lar, tümörijeniz, tümör gelişimi ve anjiyogenezde anahtar rol oynayan ve onkogenik veya tümör baskılayıcı rolleri olan önemli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde yer alabilir (78). Bunu, binlerce protein kodlayan ve kodlamayan genin ekspresyonunu kontrol etme yetenekleri ve

promotere bağı RNA'lar (paRNA'lar) yoluyla genlerin transkripsiyonunu düzenleme yetenekleri yoluyla yaparlar. Halen, çoğu bilinmeyen fonksiyonlara sahiptir. Kanser özellikleri, insan tümörlerinin geliştirilmesinde aşamalı olarak elde edilen biyolojik yetenekleri içerir (79). MicroRNA'lar bu belirteçleri etkileme potansiyeline sahiptir. Örneğin miR-200's invazyon, miR-17-92 büyüme baskılayıcılarından kaçınma, miR-29/30 sınırsız çoğalma, miR-18a anjiyogenezis, miR23 enerji metabolizmasını değiştirme, miR-124 bağışıklık sisteminden kaçma, miR-185 apoptozdan kaçınma, let-7a ise çoğalma sinyalinin sürdürülebilmesinde etkilidir (80). Bu etkileşimlerin uygulanabilirliğinin tanınması, bu küçük ancak güçlü RNA'ların bolluğu ve fonksiyonlarının çeşitliliği miRNA'ları bir düzenleyici molekül sınıfı olarak belirlemekle birlikte bu moleküller biyobelirteçler ve terapötik maddeler olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (52). MiRNA'lar epigenetik mekanizmalara etki ederek akciğer (81), AML (103-78), kolon (82), mesane ve prostat (83) kanserindeki ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişikliklerde rol almaktadır.

2.2.3. Kromatin Yeniden Düzenlemesi

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, miRNA regülasyonun yanı sıra kromatin yeniden düzenlenmesi de 4 temel epigenetik mekanizma içerisinde yer almaktadır (84). Kromatinin yeniden düzenlenmesinde rol alan 4 aile, ATPase alt ünitesinin iki bölgesi arasında ve etrafında yerleştirilmiş benzersiz alanların varlığı ile ayırt edilir. Şekil 2-10'de görüldüğü üzere Tüm kromatin yeniden şekillendiricileri, Süper Aile 2 (SF2) DNA helikazlarında bulunan bir DExx ve HELICc motiflerinden oluşan bir SWI/SNF ATPase alanı olan bir katalitik alt birim içerir. ATPase alanı, histon oktamere etrafına DNA yer değiştirmesi için motor sağlar. Remodeling kompleksleri ayrıca, katalitik alt üniteye bulunan eşsiz alanlara dayanarak dört ana aileye ayrılır. SWI / SNF ailesi, ATPase alanlarını çevreleyen bir N-terminal helikaz-SANT (HSA) ve C-terminal Bromo alanına sahiptir. ISWI ailesinin C terminalinde bir SANT SLIDE alanı var. CHD ailesi, ATPase bölgesinin üstündeki iki taneli kromalanlara sahiptir. INO80 ailesi, ATPaseinin yukarısında bir HSA alanı içerir ve iki ATPase motifi arasında kısa bir ekleme yapan diğer üç ailenin aksine, INO80 ailesi uzun bir ekleme yapar. (85).



Şekil 2- 10. Kromatin yeniden düzenlenmesinde sorumlu gen aileleri (85).

Kromatin yeniden düzenlenmesinden sorumlu olan SWI/SNF ailesi, hücre döngüsünü, hücre ölümü veya hayatta kalma, farklılaşma, genomik kararsızlığı ve DNA onarımını düzenler. Ek olarak, SWI/SNF alt birimlerinin etkisizleştirilmesi ayrıca hedef genlerinin ekspresyonunu da bozar. Örneğin, *RG1*'in kaybı, çok sayıda önemli kanserle ilişkili gen geninde nükleozom pozisyonunu değiştirerek tümörün agresifliğini artırır ve bu nedenle, bu tür hedef genlerin ekspresyonunu ve bunun sonucunda ortaya çıkan ekspresyon azalışı sinyal yollarını etkiler (86). *EP300* ve *CREBBP* mesane kanseri tümörleri içerisinde en yüksek mutasyona uğrayan kromatin remodeling genleri olduğu bilinmektedir (87).

2.2.4. Biyobelirteç

Biyobelirteç, vücut sıvısı, kan veya dokuda bulunan biyolojik sistemde maruz kalma süresi, etki, duyarlılık veya klinik hastalık göstergesi olarak ölçülen bir moleküldür. Vücudun bir hastalık veya durum için uygulanan tedaviye ne kadar iyi yanıt verdiğini gözlemlemek için biyobelirteç kullanılabilir. Ayrıca moleküler marker ve imza molekülü olarak da adlandırılır (88). Biyobelirteçlerin hastaya rahatsızlık vermeden kolay alınması, çok sayıya numunenin kısa sürede işlenmesine olanak sağlayan analiz yöntemlerinin bulunması ve bunların kantitatif sonuçlar vermesiyle birlikte ucuz olması bir avantaj olup kanser gözlemlerinde prostat kanseri için *PSA*, over kanserleri için *CA 125*, hepatoselüler kanserler için *AFP*, kolorektal için *FOBT*, nöroblastoma için *VMA*, *HVMA* ve mide kanseri için pepsinojen belirteç olarak

kullanılmaktadır (89). Epigenetik değişikliklerin gen ifadesini baskılaması, çevresel faktörler nedeniyle değişikliklerin meydana gelmesi, erişebilirliği, stabil olması gibi özellikleri nedeniyle klinik uygulamalar için olağanüstü bir biyobelirteç potansiyeli taşımaktadır (90). Hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan bir tümör baskılayıcı gen olan *PTEN*'de meydana gelen değişiklikler, delesyonlar, prostat kanserinde kötü prognoz ve tedaviden sonra nüks ile ilişkilendirilmiştir (91). *p16^{Ink4a}*, kolorektal kanser örneklerinin %27'sini ve akciğer kanser örneklerinin %24'ünü içeren çeşitli tümör tiplerinde hipermetile edilmiş halde, DNA hasarı oluşumunu geri çevirerek genom onarımına katkıda bulunan bir gen olan *MGMT*, beyin tümörü örneklerinin yaklaşık %40'ında ve kolorektal tümör örneklerinin ise %46'sında epigenetik olarak bastırıldığı gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak *GSTP1* hipermetilasyonu meme, prostat kanseri ve büyük B hücreli lenfomada için rapor edilmiştir (92). OSCC dokularından ve oral premalign lezyonlardan (OPL) elde edilen DNA örnekleri karşılaştırıldığında, neoplastik dokular, sağlıklı veya eşlenik normal dokulara göre daha sık ve daha yüksek seviyede DNA metilasyonu sergilediklerini ortaya konulmuştur (93). Günümüzde yapılan çalışmalara göre OSCC için hipermetilasyon gözlemlenen ve biyobelirteç olarak kullanıma uygun aday genler Tablo 2-7'de gösterilmiştir (94).

Tablo 2- 6. OSCC'de hipermetile aday genlerin potansiyel biyobelirteç uygulamalarına göre sınıflandırılması (91).

Biyobelirteç Tipi	Gen
Tanı	<i>CYCA1, EDNRB, KIF1A, RUNX3</i>
Prognostik	<i>p14, p16, MGMT, ECAD, DCC, DAPK1</i>
Tahmin	<i>p16, RASSF</i>
Tarama	<i>p15, EDNRB</i>

2.3. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini ve bunların bileşenleri ile kromozom morfolojisini etkileyerek gen aktivitesini etkileyerek, hücre farklılaşmasına etkisi olan bir olaydır. (95,96). DNA metilasyonu, genellikle transkripsiyonel bir baskı yoluyla ilişkilendirilen omurgalı genomlarında meydana gelen majör epigenetik bir modifikasyonudur. Embriyogenez sırasında DNA metilasyonu, diğer epigenetik faktörlerle birlikte hücre kimliğinin belirlenmesinde ve korunmasında önemli bir rol oynar (97,98).

2.3.1. DNA Hipometilasyonu

DNA metilasyonunu kansere bağlayan en eski kanıt olan global hipometilasyonu 1983 yılında Andrew Feinberg ve Bert Vogelstein'in öncü çalışmaları sonucunda keşfedilmiştir. Birçok CpG adacıkları somatik hücrelerde belirli seviyede metile halde bulunurken, High-throughput genomik DNA metilasyon çalışmaları, hipometile edilmiş bölgelerin sıklığının, tümörlerde oldukça yüksek olabileceğini ve farklı kanserlerde DNA metilasyonu seviyesinde azalma görülen çok sayıda genin tanımlandığını belirlemiştir (99). DNA hipometilasyonu, onkogenlerin transkripsiyonel aktivasyonu, transpozon elementlerin yeniden aktifleştirilmesi gibi olaylar sonucu tümörogenezi başlatabilir. DNA hipometilasyonu kromatin bütünlüğüne direkt etkiye sahiptir ve böylece kromozomal yeniden düzenleme sıklığını artırarak kromozomal kararsızlığı oluşturmaktadır (100). Mide (101), kolorektal (102), renal hücreli (103), meme (104), ovaryum (105), Wilms tümörü ve karsinomları üzerine yapılan DNA hipometilasyon çalışmaları bu mekanizmanın kansere olan etkisini desteklemektedir (106).

2.3.2. DNA Hipermetilasyonu

Bir genin promotör bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu, transkripsiyon başlangıcına müdahale ederek gen transkripsiyonunu inhibe eder ve gende bir mutasyon gözlenmeden uğramadan tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi için alternatif bir mekanizma görevi gösterir. Epigenetik değişiklikler, tümörogeneze ve malin ilerlemenin farklı aşamalarında meydana gelebilir. Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonla susturulması, tümörün ilerlemesine katkıda bulunan önemli bir epigenetik değişikliktir (107). Tümör baskılayıcı genlerin yanı sıra, hipermetilasyon kanserin başlangıcı ve ilerlemesi için diğer genleri de güçlü bir şekilde etkilemektedir. Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmaya göre otofaji-ilişkili genlerde

meydana gelen hipermetilasyona bağlı gen susturulması mide epitel hücrelerinin karsinojenik transformasyonu ile direkt olarak ilişkili bulunmuştur (108). DNA hipermetilasyonu mekanizması, retinoblastoma’da tümör baskılayıcı bir gen olan *RB1*’in (109) promot rlerinin, kolon kanserinde DNA tamir mekanizmasında rol alan *MLH1*’in (110), meme ile over kanserinde *BRCA1*’in (111), gastrointestinal kanserde telomeraz oluşumu için bileşenlerin üretilmesini sağlayan *TERT*’in (112), akciğer kanserinde DNA yanlış eşleşme tamir mekanizmalarında yer alan h*MSH2*’nin (113), promoterlerinin hipermetilasyonu ile oldukça yaygındır ve iyi açıklanmıştır.

Hemen hemen her tümör  eřit  kendine özgü bir promoter metilasyon durumuna sahip olduğu için her bir kanser çeşitine ait makul boyutta gen panellerinin oluşturulması, kanserin erken teşhis, prognoz ve değerlendirilmesi için gereklidir. Bunları oluşturmak için ise DNA metilasyon mekanizmasını anlamak oldukça önemlidir (114). Çeşitli kanser tiplerinde yer alan ve promoter bölgelerinde hipermetilasyona gözlenen genler ve bunların fonksiyonları Tablo 2-6’da gösterilmiştir.

Tablo 2- 7. En sık bildirilen kanser türlerinde promoter hipermetilasyonuna uğrayan genler (25).

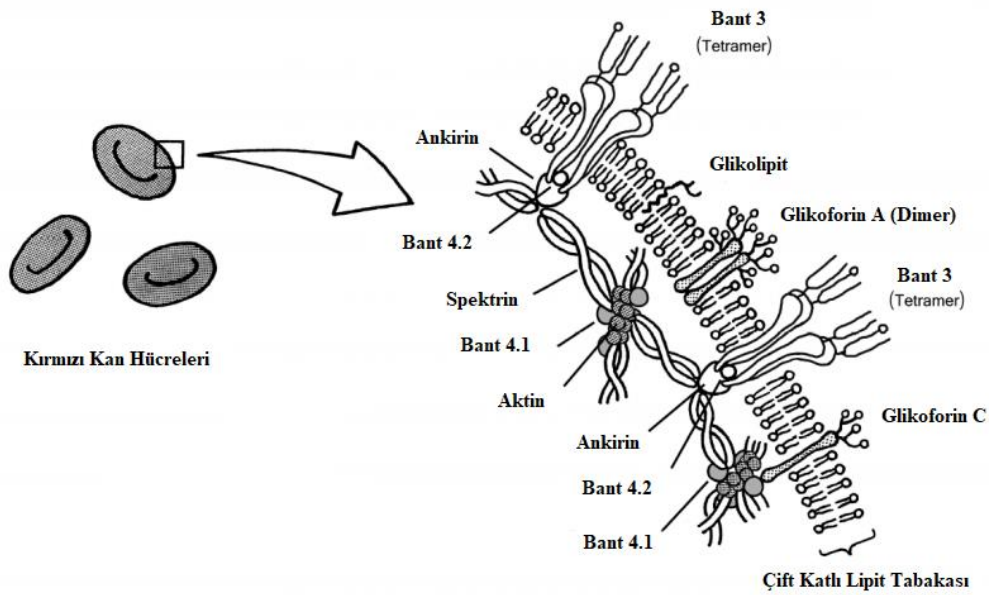
Gen	Fonksiyonu	Meme Kanser	Akciğer Kanser	Prostat Kanser	Lösemi/Lenfoma	Kolon Kanser
<i>APC</i>	Hücre göçünde ve adezyonda yer alan Wnt sinyal yolağının düzenlenmesinde rol oynar	X	X	X	–	X
<i>BMAL1</i>	Sirkadiyen saatin temel bileşeni	–	–	–	X	–
<i>BRCA1</i>	DNA tamir mekanizması ve transkripsiyonda rol alır	X	–	–	–	–
<i>CDH1</i>	E-cadherin, hücre yapışmasında rol alır	X	X	X	X	X
<i>CDH13</i>	H-cadherin, hücre yapışmasında rol alır	X	X	–	X	X
<i>CDKN2A (p16^{INK4a})</i>	CDK4 inhibitörü, G1 fazında hücre döngüsünü kontrol eder.	X	X	X	X	
<i>CDKN2B (p15^{INK4b})</i>	CDK4 ve CDK6 inhibitörü, hücre döngüsü G1 ilerlemesinin kontrol eder	–	–	–	–	X
<i>p14^{ARF}</i>	Hücre siklusu G1 ilerlemesinin kontrolünde ve tümör baskılayıcı protein p53'ün dengelenmesinde görev alır	–	–	–	–	X
<i>COX2</i>	Siklooksijenaz, prostaglandin biyosentezinde rol alır.	–	–	–	–	X
<i>CRBP1</i>	Epitel dokularının büyümesi veya farklılaşması için gerekli olan retinolün taşınmasında görev alır.	–	–	–	X	X
<i>DAPK1</i>	μ-interferonun neden olduğu programlanmış hücre ölümünün pozitif aracısı olarak görev alır.	–	X	–	X	X
<i>ESR1</i>	Östrojen reseptörü ve gen ekspresyonunda rol alır.	X	X	X	X	–
<i>GATA4</i>	Zinc-finger'ın GATA ailesinin transkripsiyon faktörü olarak görev alır.	–	–	–	–	X
<i>GATA5</i>	Zinc-finger'ın GATA ailesinin transkripsiyon faktörü olarak görev alır.	–	–	–	–	X
<i>GSTP1</i>	Genotoksik yabancı bileşiklerin metabolizması, detoksifikasyonu ve giderilmesinde görev alır.	–	X	X	–	–
<i>HIC1</i>	Transkripsiyon Faktörü	X	X	–	X	X
<i>IGFBP3</i>	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein	–	X	–	–	–
<i>MGMT</i>	DNA tamirinde görev alır.	–	X	–	X	X
<i>MLH1</i>	DNA yanlış eşleşme tamiri ve DNA hasar sinyalleşmesinde görev alır	–	–	–	–	X
<i>PYCARD</i>	TMS1 / ASC ve apoptotik sinyal yollarında rol oynar.	X	X	–	–	–
<i>RARB2</i>	Rretinoik asit reseptörü, gen ekspresyonunu düzenleyerek birçok hücre tipinin büyümesini sınırlar	–	X	–	X	X
<i>RASSF1A</i>	G1 / S fazında hücre döngüsü durdurmada rol alan siklin D1'in birikmesini önler.	X	X	X	X	X
<i>TP73</i>	p53 transkripsiyon faktör ailesi, DNA hasarına apoptotik cevapta göre v alır.	X	–	–	–	–

*X, bildirilen hipermetilasyon.

2.4. Glycophorin C (GYPC)

GYPC geni (13.5 kbp) dört ekzon içerir, 2. kromozomun q kolunun 14. bandına lokalize olup, eritrositler tarafından taşınan ve membrana entegre olabilen Glycophorin C proteinini kodlamakla birlikte Glycophorin A/B ile de benzer özellikler göstermektedir. *GYPC* geni, alternatif translasyon başlangıç bölgelerini kullanarak

glikophorin C (GPC) ve glikophorin D'yi (GPD) kodlar. GPC ve GPD, protein 4.1R ve p55 ile etkileşime girer ve kırmızı kan hücrelerinin sitoskelet yapısına katılarak zar stabilitesini sağlar [7]. Eritrosit membran proteinleri transmembran ve periferik membran proteinleri olarak 2'ye ayrılmaktadır. Band 3 ve glycophorinler de hücre iskeletine katılan (protein ağı örtüsünü oluşturan) transmembran protein sınıfına girmektedir. Band 3 ve glycophorinlerin kırmızı kan hücrelerindeki lokalizasyonu şekil 2-11'de gösterilmiştir (115).



Şekil 2- 11. Glycophorin ailesi ve Band 3'ün Eritrositlerdeki lokasyonu (115).

Bu gen ve ürünleri hücrenin morfolojik yapısını etkilediği için, eksiklik görülmesi durumunda membran bozukluğuna yol açarak eliptositoz görülmektedir. Herediter eliptositoz otozomal dominant geçiş özelliğine sahiptir. Bunun dışında insanlardaki eritrositlerin çok az bir miktarı elips şekline bulunmaktadır. Orak hücreli anemi, lösemi, talasemiler, demir ve eritrosit enzim eksikliği kaynaklı hemolitik anemilerde yalnızca oval ve eliptik şekilde eritrositler görülmesine rağmen bunların sayıları yine de az olup boyları da kısa şekildedir (116). Aynı zamanda Gerbich kan grubu sisteminin yüksek frekanslı antijenleri olan Ge2, Ge3 ve Ge4'ü taşıyan sialoglikoproteindir. Çoğunlukla sivrisinekler tarafından taşınan plazmodyum parazitinin GPC ve GPD reseptörlerinde meydana getirdiği bozulma birkaç kan grubu antijeni taşıma özelliğine sahip (Gerbich, Yus, Wb, Ana ve Dha ve diğerleri)

Glycophorin C (GYPC)'yi etkileyerek nihayetinde sıtma hastalığının görülmesinde etkilidir (117).

Gerbich kan grubu antijenlerine karşı olan antikorlar, transfüzyon ve gebelikte göz önünde bulundurulması önemlidir. Antikorlar hemolitik transfüzyon reaksiyonları ve yenidoğanın hemolitik hastalığı ile ilişkili olabilir. Gerbich antikorları, hamilelikte özellikle klinik öneme sahiptir, çünkü genellikle geç başlangıçlı bir anemi ile ilişkilidirler. Bu aneminin mekanizması, Kell antijenlerine karşı gözlemlenen antikorlarla benzerlik gösterir (118).

In vitro çalışmalar, glikophorin C'ye karşılık gelen antikorların, mitokondriyal depolarizasyonu indükleyerek ve hücre içi fosforilasyon yollarını olumsuz etkileyerek erken eritroid progenitör hücrelerinin büyümesini önlediğini göstermiştir; bu olay aktin polimerizasyonuna ve kaspazdan bağımsız apoptozun indüklenmesine yol açarak ontogeni sırasında eritroid progenitör hücrelerinde erken glikophorin C ekspresyonu gözlemlenir. Sonuç olarak, hamilelik ve doğum sonrası, Gerbich antikorları yalnızca klasik makrofaj bağımlı eritroid hücre yıkımına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda erken eritroid progenitör hücre proliferasyonunu da inhibe eder. Gerbich maternal antikorları nedeniyle fetus ve yenidoğanın hemolitik hastalıklarında retikülositoz yokluğu, eritroid hücre proliferasyonunu etkiler (119).

2.4.1. GYPC ve Kanser İle İlişkisi

GYPC geni anemi, sıtma, hamilelik ve kan grupları gibi durumlarla ilişkili olduğu gibi prostat, lösemi ve meme kanseri gibi kanser çeşitlerinde de etkili olduğu literatürde belirtilmiştir (10, 11, 12, 117, 120, 121, 122).

Almanya'da Resenburg Üniversitesinde yapılan bir prostat kanseri çalışmasında, kemik iliğine metastaz yapan ve yapmayan prostat kanseri hastaları ile sağlıklı kontrol için kanser tanısı konulmamış bireylerden kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Örneklerin transkriptom analizi sonucunda *GYPC* ekspresyonunda sağlıklı kontrole göre bir artış gözlemlenerek metastaz takibi için bir belirteç adayı olabileceği öne sürülmüştür (120).

Zhu ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada kullanılan AML (akut miyeloid lösemi) örnekleri gen ekspresyon array metodu ile FLT3-ITD mutasyonu ile ilişkili tüm genom ekspresyonları incelenmiş ve *GYPC* geninde ekspresyon azalışının

tanı veya tedavide biyobelirteç olarak kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu bildirmiştir (10). Ngo ve ark. yaptığı AML çalışması bu sonuçları desteklemektedir (121).

Çin’de yapılan bir araştırmada ise 38 ALL (akut lenfoblastik lösemi) tanısı konulan ve kontrol amaçlı kanser olmayan 20 sağlıklı kan örneği çocuklardan alınarak RT-PCR’da *GYPC* ve *TRIP3* geninin ekspresyon durumu incelenerek *GYPC* geninde gözlemlenen artışın akut lenfoblastik lösemi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(11). Villevall ve arkadaşlarının yaptığı ALL çalışması, aynı şekilde *GYPC* geninin ekspresyonunda artış bulmuş ve buna ek olarak hücre yüzey morfolojilerinde değişiklikler tespit etmiştir (122). Buna ek olarak *GYPC* geninin meme kanserindeki bir DNA metilasyon korelasyon ağında yüksek ve düşük risk gruplarını ayırmada rol oynayabileceği bildirilmiştir (127).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulunca 2018/1087 no'lu dosya onayı alınan çalışmamızda yer alan gönüllüler İTF Kulak Burun Boğaz Hastalıkları tarafından, çalışma hakkında bilgilendirildi ve rızası alınan hasta ve sağlıklı bireylere ait doku ve serum örnekleri toplandı.

Elde edilen doku ve serum örnekleri laboratuvarımızda -80°C'de dondurularak saklandı ve mikrodiseksiyon yoluyla %70 saflık derecesine sahip olan tümör örnekleri belirlenerek deneye dahil edildi. Periferik kan örneklerinden santrifüj yolula elde edilen serum örnekleri ise vakit kaybedilmeden -80°C de saklandı.

3.1. MATERYAL

3.1.1. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Cihazlar

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

3.1.2. Deneylerin Gerçekleştirilmesi Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyler için gerekli kimyasal maddeler Tablo 3-1.'de verilmiştir.

Tablo 3- 1. Kimyasal Maddeler.

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

3.1.3. Deneylerin Gerçekleştirilmesi İçin Kullanılan Kimyasal Karışımlar

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli kimyasal karışımlar ve içerikleri Tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3- 2. Kimyasal Karışımlar.

Parçalama Tamponu :	155 mM NH ₄ Cl
	10 mM KHCO ₃
	0.1 mM EDTA (pH: 8.0)
SE Tamponu :	75 mM NaCl
	25 mM EDTA
	30 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
TE Tamponu :	20 mM Tris-HCl (pH: 8.0)
	1 mM EDTA (pH: 8.0)
Fenol için TE Tamponu (0,5 ml):	0.25 mM Tris (pH:8.0)
	0, 5 mM EDTA (pH:8.0)
Fenol/Kloroform/İsopropanol:	(1:1):1 (Fenol/Kloroform) / İsopropanol
Proteinaz K:	20 mg / ml
Ribonükleaz A:	10 mg / ml
SDS (%10; pH:7,2) ()	100 g sodyumdodesilsülfat

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Materyal Toplama ve Eldesi

3.2.1.1. Doku Eldesi

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi KBB Hastalıkları ve Baş-boyun Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından OSCC kanseri tanısı almış 50 hastanın cerrahi müdahalesi sırasında alınacak 0,5 cm çapında tumor/eşlenik normal doku örneği ve kendisinde ve ailesinde malin hikayesi bulunmayan herhangi bir sebeple cerrahi operasyon uygulanmasına karar verilmiş olan 10 bireyden uvulopalatofaringoplasti (UPPP) tekniği ile 0,5 cm çapında mukoza örneği alındı. Toplanan materyaller ameliyat sonrasında ivedilikle buz içerisinde laboratuara teslim edilerek DNA ve RNA izolasyonu işlemlerine kadar -80°C’de muhafaza edildi.

3.2.1.2. Serum Eldesi

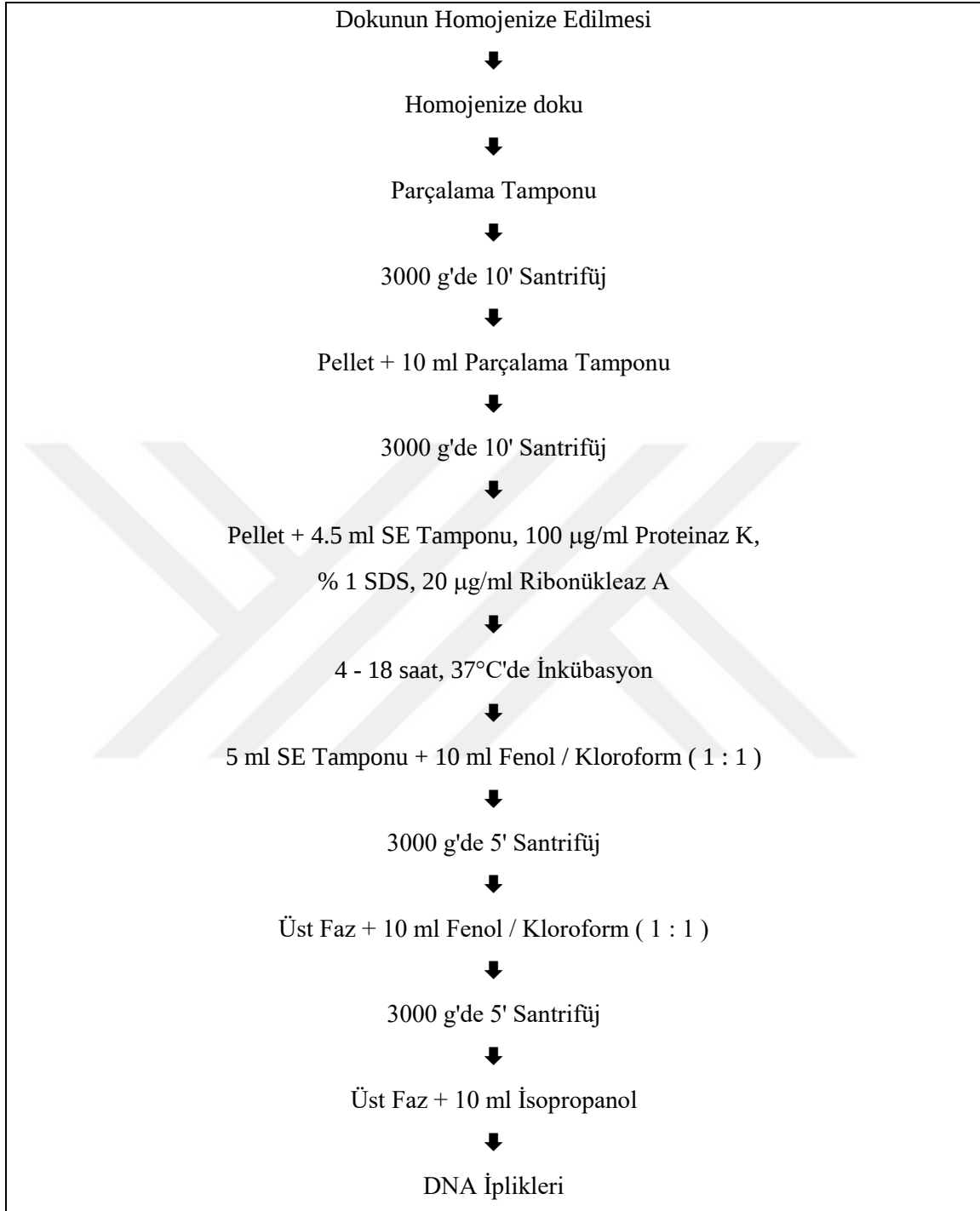
Ameliyat öncesi, hasta ve sağlıklı bireylerden kuru tüp (serum ayırma tüpü) içerisinde 8-10 mL hacminde periferik kan örnekleri toplandı ve bu tüpler laboratuvarımızda bulunan santrifüjde 1950 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Ardından üstte kalan serum kısım (sarı faz) kriyotüplere dağıtıldı.

3.2.2. DNA İzolasyon İşlemleri

3.2.2.1. Dokudan DNA İzolasyonu

Cerrahi müdahale öncesi ve sonrasında toplanan sağlıklı ve hasta bireylere ait örneklerinden (serum ve doku örnekleri) DNA eldesi Tablo 3-1’de gösterilmiştir. Dokular homojenizatör ile parçalandıktan sonra proteinaz K (Boehringer-Mannheim, Germany) ile muamele edilerek 48°C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ardından DNA iplikçiklerinin elde edilmesi için fenol/kloroform ekstraksiyonu işlemi uygulandı. Daha sonra elde edilen DNA örneklerinin ölçümü ve kontrolü %0,8’lik agaroz gel elektroforezinde gerçekleştirildi. Örneklerin miktar tayini ise Nanodrop 2000[©] (Thermofisher, ABD) cihazı ile yapıldı. Bu DNA örneklerinin metilasyon deneylerinde kullanılması için gerekli olan bisülfite dönüşümüne kadar -20°C’de saklandı.

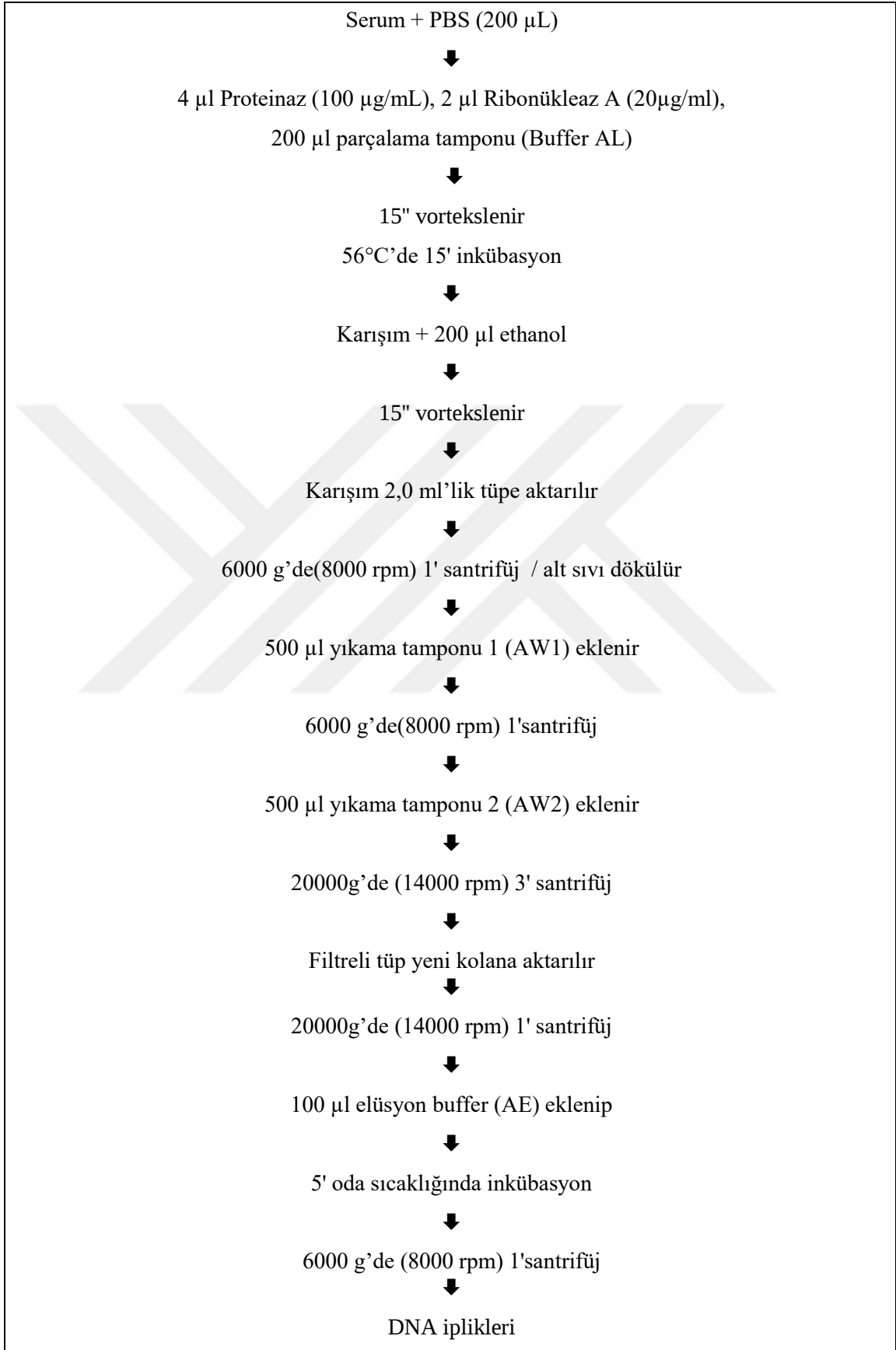
Tablo 3- 3. Dokudan DNA izolasyon işlemi.



3.2.2.2. Serum Örneklerinden DNA İzolasyon İşlemi

Ameliyat öncesi toplanan serum örneklerinden DNA izolasyonu QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Almanya) ile firmanın belirlediği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3- 4. Serumdan DNA izolasyon işlemi

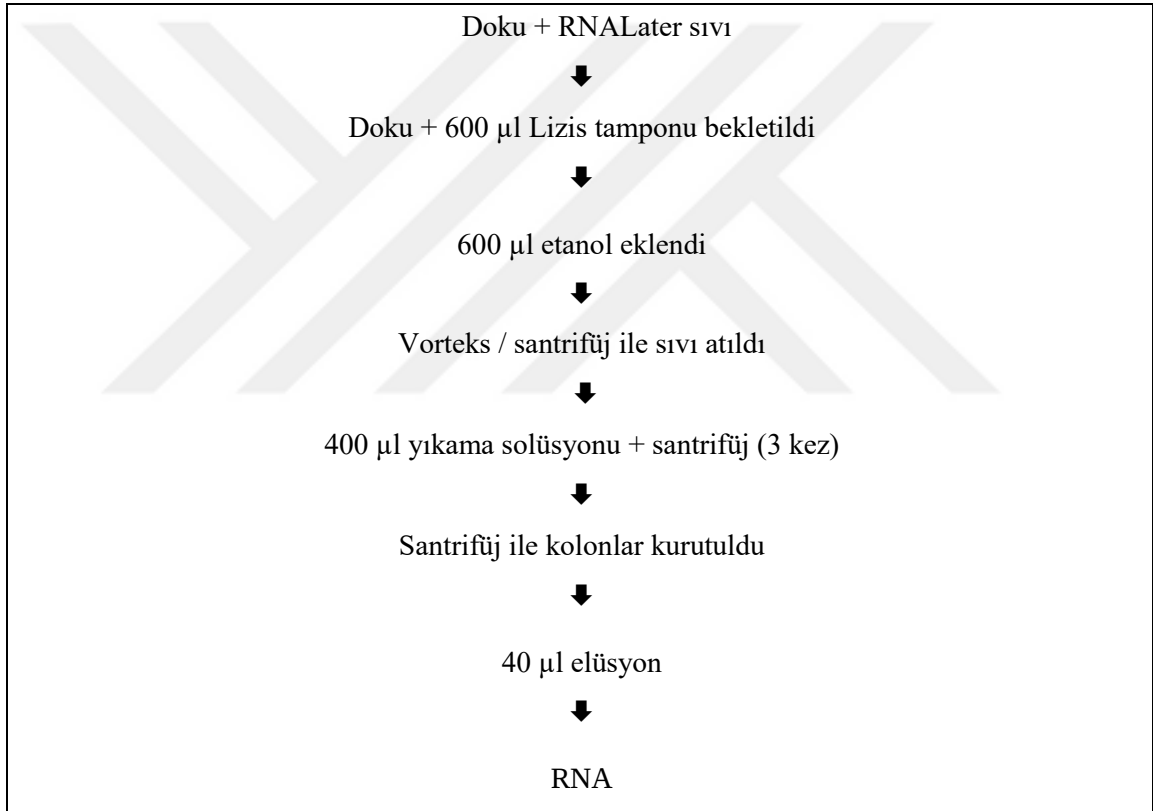


Tablo 3-2’de bulunan kit protokolüne göre DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen DNA örnekleri -20°C’de saklandı.

3.2.3. Total RNA İzolasyonu

Doku örneklerinin total RNA izolasyonu “Norgen Total RNA Purification Kit” (Norgen, Ontario, Kanada) protokolüne uygun biçimde Tablo 3-3’te gösterildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3- 5. RNA izolasyon işlemi



İzolasyon işlemi sonrasında izole edilen total RNA’ların tayini Nanodrop 2000© (Thermofisher, ABD) cihazı ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ekspresyon deneyleri için gerekli olan cDNA dönüşümü işlemi için -80°C’ de muafaza edildi.

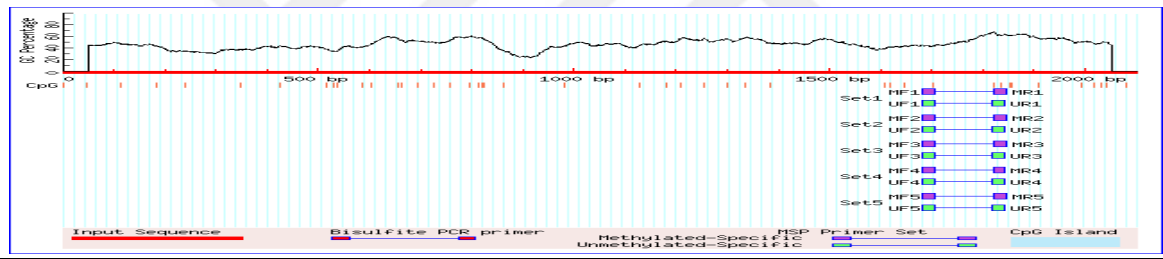
3.2.4. Metilasyon ve Ekspresyon Deneyleri İçin Primer/Prob Tasarımı

Çalışmada yer alan *GYPC* geninin metilasyon ve ekspresyon profilini incelemek için gerekli primer ve prob tasarımları internette kullanıma açık olan Methprimer (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) ve Primer3Plus

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) programları ile tarafımızca tasarlanmıştır (Tablo 3-4). Ayrıca Tablo 3-5'te gösterilen ve çalışmada referans gen olarak kullanılan *ACTB* geninin primer ve problemleri daha önce yapılmış olan çalışmadan alınmıştır [123].

Tablo 3- 6. Metilasyon ve ekspresyon profilleri incelenecek olan *GYPC* geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers)

<i>GYPC</i> EF	5' ACCTCCACCCCCACCATAA '3
<i>GYPC</i> ER	5' TGACGAAGAGGAGGGAGAC '3
<i>GYPC</i> MF	5' TCGTAGTTGAGAGAGGTCGT '3
<i>GYPC</i> MR	5' TCCTACGCAAAAACCACGCT '3
<i>GYPC</i> Probe	5' ATTTAGCGGTCGCGTAGTTAGTTAA '3



Tablo 3- 7. Referans *ACTB* geninin primer ve prob tasarımı. (EF: Ekspresyon Forwad, ER:Ekspresyon Revers, MF: Metilasyon Forward, MR:Metilasyon Revers)

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

3.2.5. Metilasyon Analizi

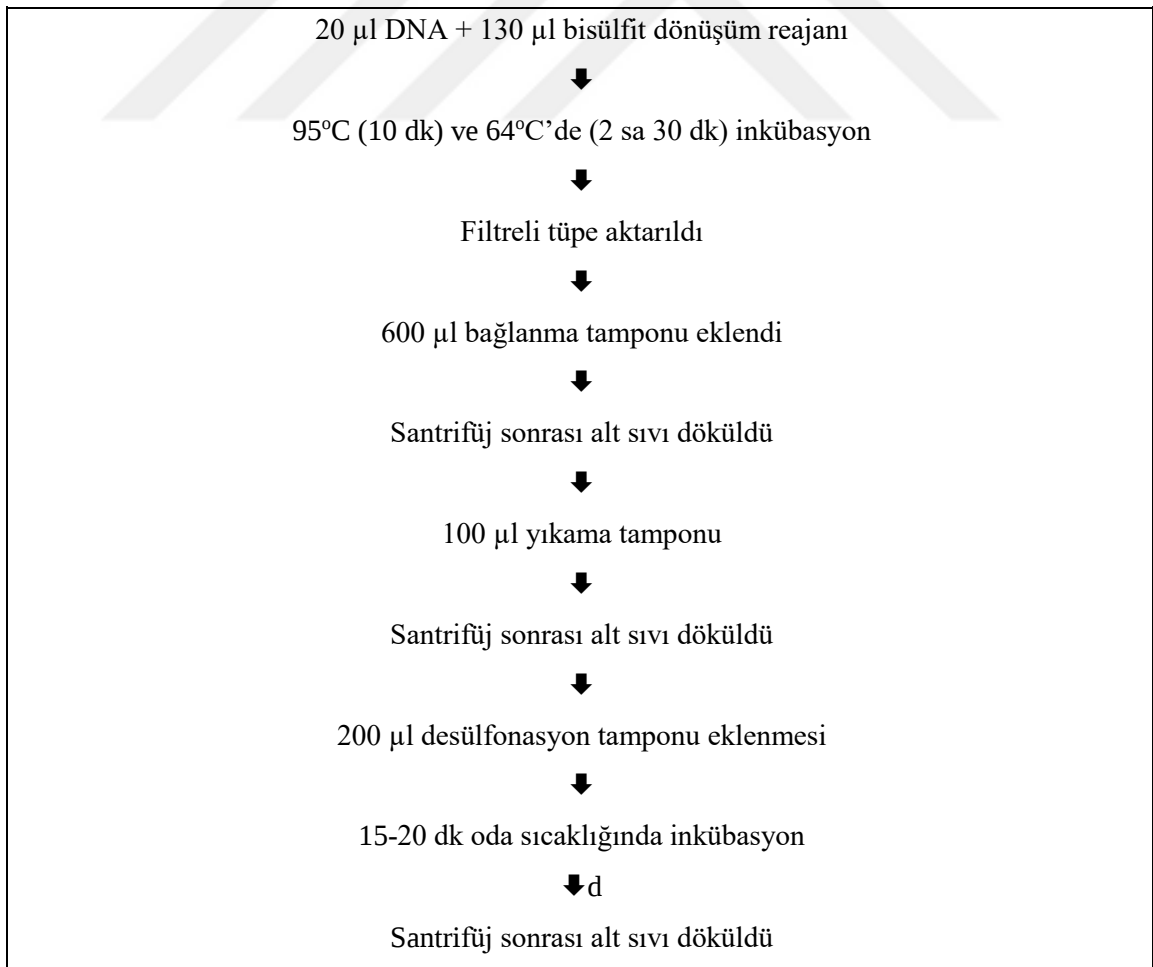
Hasta ve sağlıklı bireylere ait doku(tümör ve eşlenik normal) ve serum örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin *GYPC* genindeki promoter bölgesindeki metilasyon durumu PCR yöntemi ile LightCycler 480 cihazında incelendi. Örneklerin

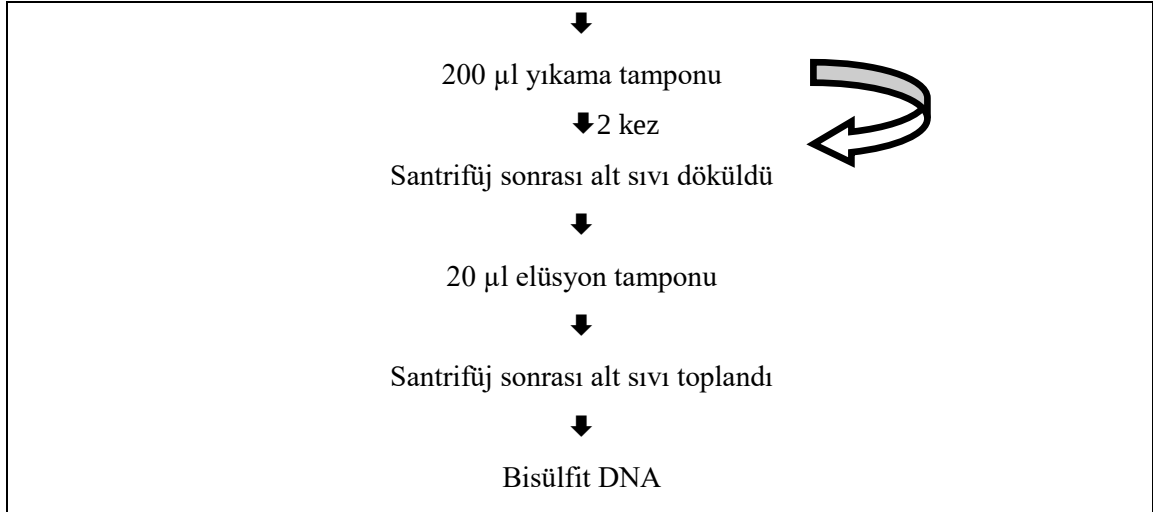
bisülfıt dönüşüm kit protokolünce sodyum bisülfıt ile muamele edilmesi sonucu oluşan kimyasal modifikasyon sonrası metile olan bölgelere özğü primerler ve hibridizasyon problemleri kullanıldı. Deneyin kontrolü için gereken negatif kontrol DNA içermeyen örnekler ile pozitif kontrol ise sağıklı bireylerden elde edilen lenfosit DNA' örneklerinin SssI metiltransferaz ardından bisülfıt modifikasyonu işlemine tabi tutularak kullanıldı.

3.2.5.1. Bisülfıt Dönüşüm

OSCC tanısı konulan hasta kişiler ile kendisinde ve ailesinde hiçbir kanser öyküsü bulunmayan sağıklı bireylere ait tümör ve eşlenik normal doku ile serum örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin bisülfıt dönüşümü "Zymo Methylation Gold Kit"(Zymo research, CA, ABD) kiti tarafından Tablo 3-6'daki protokole göre gerçekleştirildi.

Tablo 3- 8. Bisülfıt DNA dönüşüm protokolü





Bisülfıt dönüşümü gerçekleştirilen DNA örnekleri QMSP aşamasına kadar -20 °C 'de saklandı.

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

GYPC geninin promoter bölgesindeki hipermetilasyon seviyelerini gözlemlemek için, kantitatif metilasyon spesifik PCR (QMSP) yöntemi ile metilasyon durumu belirlendi. Çalışma için gerçekleştirilen deneylerde, 5' ucunda 6-florosein amitid (FAM) ve 3' ucunda FAM inhibe edici (quencher) olan karboksitetrametilrodamin (TAMRA) ile işaretlenmiş TaqMan hidroliz probu kullanıldı.

Metilasyon deneyleri için pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere sağlıklı insan lenfosit DNA' sı SssI metilaz enzimi ile muamele edildi ve bunun sonucunda %100 metillenmiş standart olarak (LN-DNA) kullanıldı. Kantitatif sonuç elde etmek için standartlar; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 olacak şekilde dilüe edildi. QMSP deneylerinde kullanılan reaksiyon karışımı ve koşulları Tablo 3-7 ve Tablo 3-8'de gösterilmiştir.

Tablo 3- 9. Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon karışımı.

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

Tablo 3- 10. Metilasyon deneyleri için QMSP reaksiyon koşulları.

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

Her iki gen için ortak bir eşik değeri (threshold) belirlendi ve her gen için ayrı bir şekilde kullanılan, %100 metile olan standart ve dilüsyonlarının konsantrasyonları Ct değerlerine (floresan düzeyinin cihaz tarafından ölçülebilen eşik değeri aştığı döngü) göre, standart eğri grafiği program tarafından oluşturuldu. Her örnek için ayrı bir kantitatif sonuç elde edildi ve relatif metilasyon yüzdesi ise aşağıda belirtilen formül ile hesaplandı.

$$\text{Relatif Metilasyon Yüzdesi} = \frac{\text{HEDEF}_{\text{konsantrasyon}}}{\text{ACTB}_{\text{konsantrasyon}}} \times 100$$

3.2.6. Gen Ekspresyon Analizi

GYPC geninin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlenip, OSCC tanısı alan hastalara ait tümör/eşlenik normal doku ve serum örnekleri ile sağlıklı bireylere ait mukoza ve serum örnekleri karşılaştırıldı. Karşılaştırmak için öncelikle dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı ve bu RNA örneklerinin kalite ve miktar tayini spektrofotometre ile yapıldı. Ardından bu RNA örnekleri ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere SensiFAST cDNA Sentez Kit protokolüne tabi tutularak cDNA örnekleri elde edildi (Tablo 3-9 ve Tablo 3-10). Hazırlanan cDNA'lar -20°C 'de saklandı.

Tablo 3- 11. cDNA sentezi reaksiyon karışımı.

Solüsyon	Miktar
Toplam RNA (1 µg'ye kadar)	n µl
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
dH ₂ O	20 µl'ye kadar

Tablo 3- 12. cDNA sentezi reaksiyon koşulları.

PCR Aşaması	T (°C)	Zaman
Primer Bağlanma	25 °C	10 dk
	42 °C	15 dk
Revers Transkripsiyon	48 °C	15 dk
İnaktivasyon	85 °C	5 dk
Soğuma	4 °C	-

3.2.6.1. GYPC geninin Ekspresyon Seviyelerinin QRT-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi.

GYPC geninin ekspresyon durumu SYBR Green temelli kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (QRT-PCR) ile değerlendirildi. PCR için uygun reaksiyon karışımı hazırlanarak (Tablo 3-11), bu karışım 96 kuyulu platelere, kuyucuk başına çok kanallı pipet yardımıyla 20 µl hacimde dağıtıldı. Reaksiyon karışımı dağıtıldıktan sonra plate'in üzeri jelatin film ile kaplanarak cihazda seçtiğimiz genlere özgü sıcaklıklarda reaksiyon başlatıldı (Tablo 3-12).

Tablo 3- 13. Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon karışımı.

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

Tablo 3- 14. Ekspresyon deneylerinin QRT-PCR reaksiyon koşulları.

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

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

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

3.2.7. Veri Analizi

İstatiksel analizlerin için, IBM SPSS Statistics 20 programı kullanıldı. Klinik bilgiler ile metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmaları için ki-kare testleri

(Yates ve Fisher) kullanıldı ve bunun sonucunda $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hasta ile sağlıklı bireylerin materyallerinin metilasyon seviyelerinin kıyaslanmasında Wilcoxon Rank Testi kullanıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hastalara Ait Klinikopatolojik Veriler ile Sağlıklı Bireylere Ait Demografik Parametrelerin Özellikleri

Çalışmada kullanılmak üzere toplanmış 50 OSCC tanılı hasta ve 10 sağlıklı bireyin klinik bilgileri Tablo 4-1 ve Tablo 4-2’de gösterilmiştir. Bu hasta grubundan çalışmada kullanılmak üzere tümör ve eşlenik normal doku, sağlıklı gruptan ise normal doku toplandı. Bunlara ek olarak her iki grup için hastalardan serum örnekleri de toplanmıştır. OSCC grubu için yaş ortalaması 60 olup, sağlıklı bireylerin yaş ortalaması ise 56’dır. OSCC tanısı almış hastalarda erkek hastaların oranı (%76) kadınlara hastalara (%24) göre fazla olduğu görülürken sağlıklı kontrol grubunda iki grubun cinsiyet oranı birbirine eşittir. Hasta grubunun sigara kullanım oranı %64 (32/50) olarak tespit edildi ve bu oran sağlıklı bireylerde %50 (5/10) olarak gözlemlendi. Alkol tüketimine bakıldığında ise OSCC grubunda bu oran %18 (9/50) iken sağlıklı grupta alkol kullanımı %30 oranındadır.

TNM evrelerine göre değerlendirilen OSCC hasta grubunun evre I, evre II, evre III ve evre IV’e göre oranları sırasıyla %10 (5/50), %18 (9/50), %22 (11/50) ve %50 (25/50) olarak tespit edildi. Anatomik tutulum bölgelerine göre ayrıldığında %28 dil, %18 ağız tabanı, %16 retromolar trigon, %18 bukkal mukoza, %12 inferior alveolar ark ve %8 sert damak şeklinde gözlemlendi. Lenf nodu tutulumu görülen hastaların oranı %48 (24/50) iken hastaların %32’sinde (16/50) metastaza rastlanıldı.

Tablo 4- 1. OSCC hastalarına ait klinik parametreler.

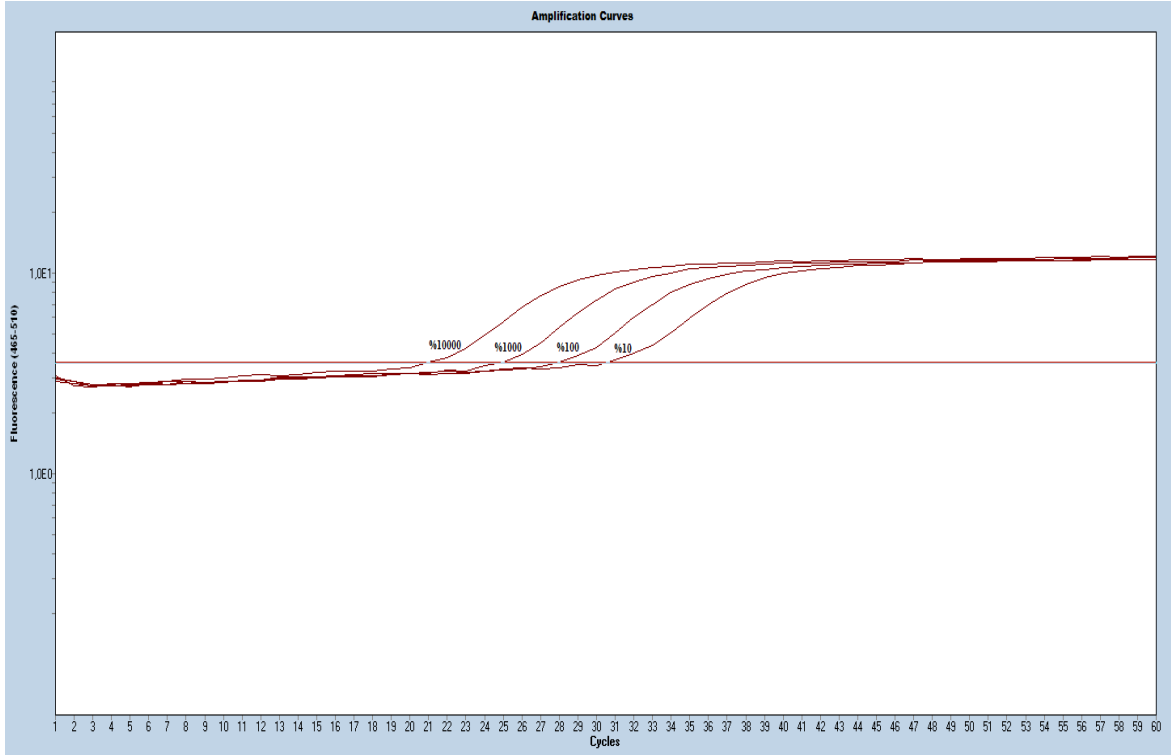
Parametreler		n (%)
Yaş	≤50	8 (16)
	>50	42(84)
Cinsiyet	Kadın	12(24)
	Erkek	38(76)
Anatomik Tutulum Bölgesi		
	Ağız Tabanı	9(18)
	Bukkal Mukoza	9(18)
	Sert Damak	4(8)
	Dil	14(28)
	İnferior Alveolar Ark	6(12)
	Retromolar Trigon	8(16)
Evre	1	5(10)
	2	9(18)
	3	11(22)
	4	25(50)
Histopatoloji	SCC	50(100)
Lenf Nodu Tutulumu	(-)	26(52)
	(+)	24(48)
Sigara	(-)	18(36)
	(+)	32(64)
Alkol	(-)	41(82)
	(+)	9(18)
Metastaz		
	(-)	34(68)
	(+)	16(32)
Diferansiyasyon Derecesi		
	Az	4(8)
	İyi	7(14)
	Orta	39(78)
Nüks	(-)	34(68)
	(+)	16(32)

Tablo 4- 2. Sağlıklı bireylere ait demografik parametreler.

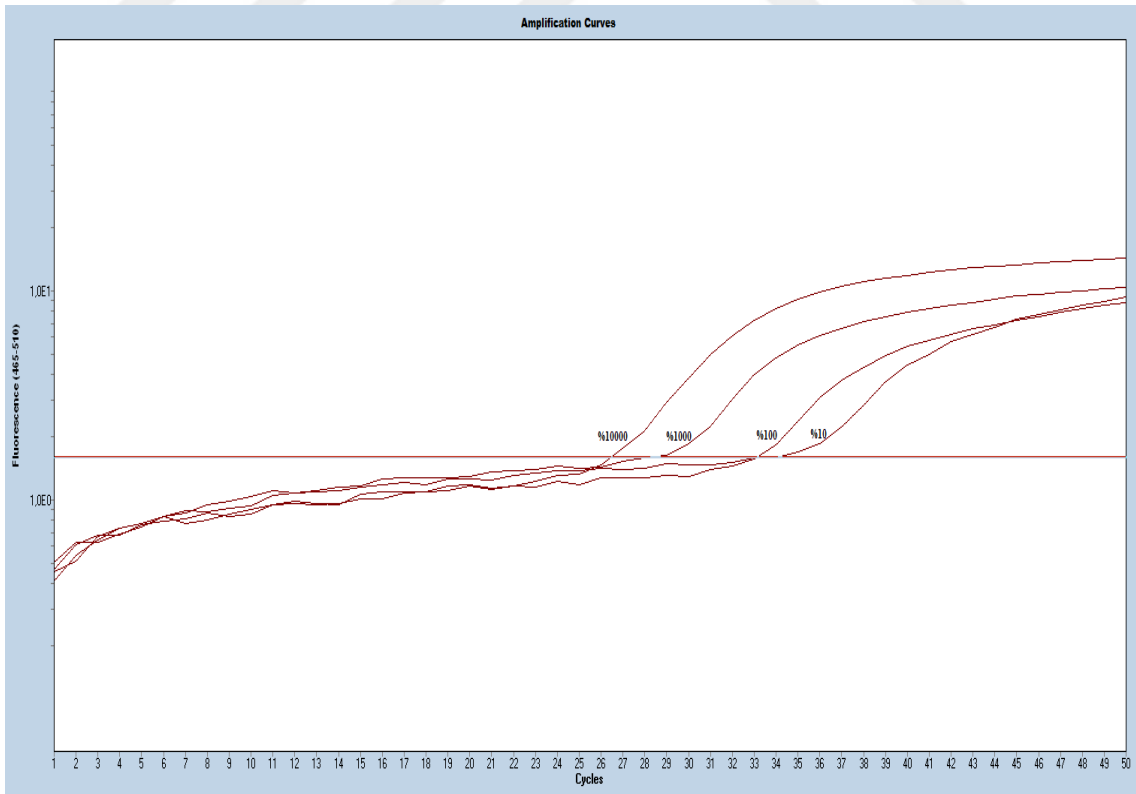
Parametreler		n(%)
Yaş	≤50	6 (70)
	>50	4 (30)
Cinsiyet	Erkek	5 (50)
	Kadın	5 (50)
Sigara	(-)	5 (50)
	(+)	5 (50)
Alkol	(+)	3 (30)
	(-)	7 (70)

4.2. GYPC Geninin Metilasyon Analiz Sonuçları

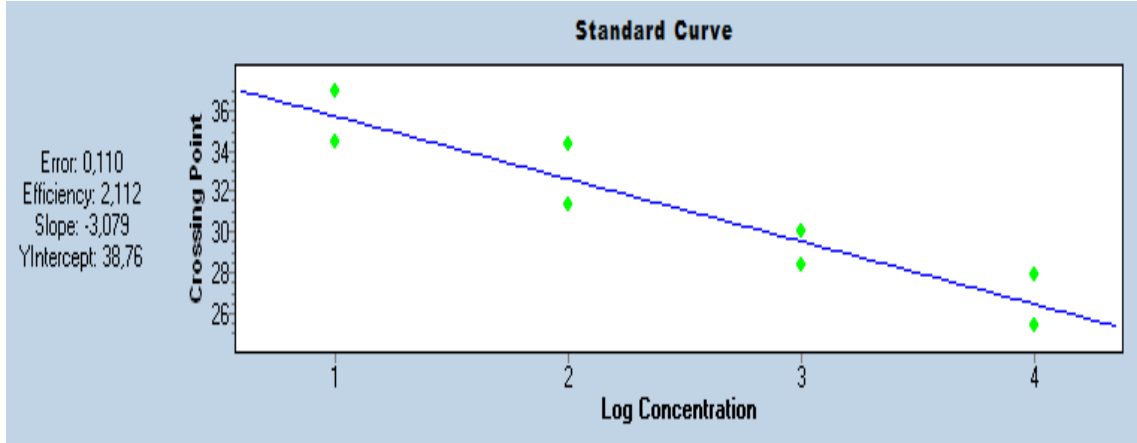
Çalışmamızda toplanılan 50 OSCC doku ve serum örnekleri ile 10 sağlıklı bireye ait doku ve serum örneklerinin metilasyon durumu Kantitatif Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (QMSP) ile incelendi. Kantitatif ölçüm yapabilmek için, %100 metillenmiş standart ve aynı standartın dilüsyonları (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) kullanılmıştır. Çalışmada negatif kontrol olarak bisülfite modifiye edilmiş LN-DNA'sı ve distile su kullanılmıştır. Deney tamamlandıktan sonra deney sonuçlarının analizi, LightCycler 480 yazılımının Absolut Hesaplama/Fit Points programında gerçekleştirildi. Referans ve hedef gene ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4-1 ve Şekil 4-2 de standart curve eğrisi ise Şekil 4-3'te gösterilmiştir.



Şekil 4- 1. %100 metile standart ve dilüsyonlarının *ACTB* genine ait amplifikasyon eğrileri.

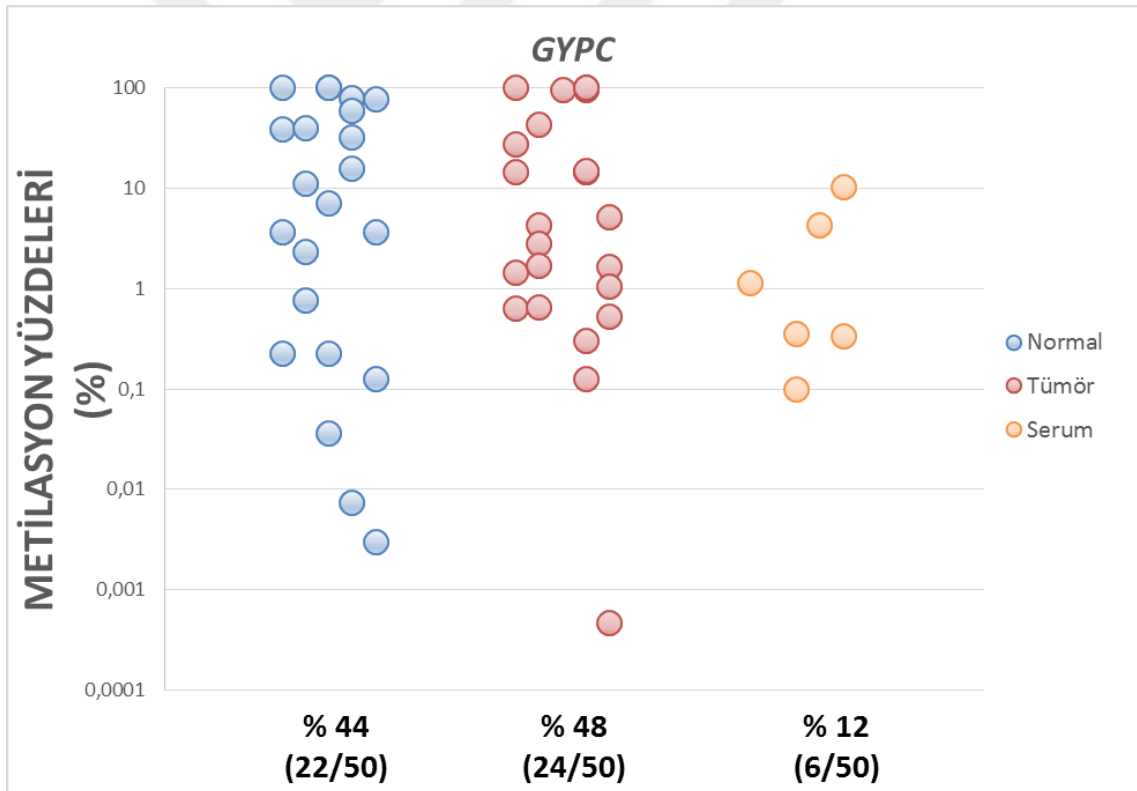


Şekil 4- 2. %100 metile standart ve dilüsyonlarının hedef *GYPC* genine ait eğrileri.



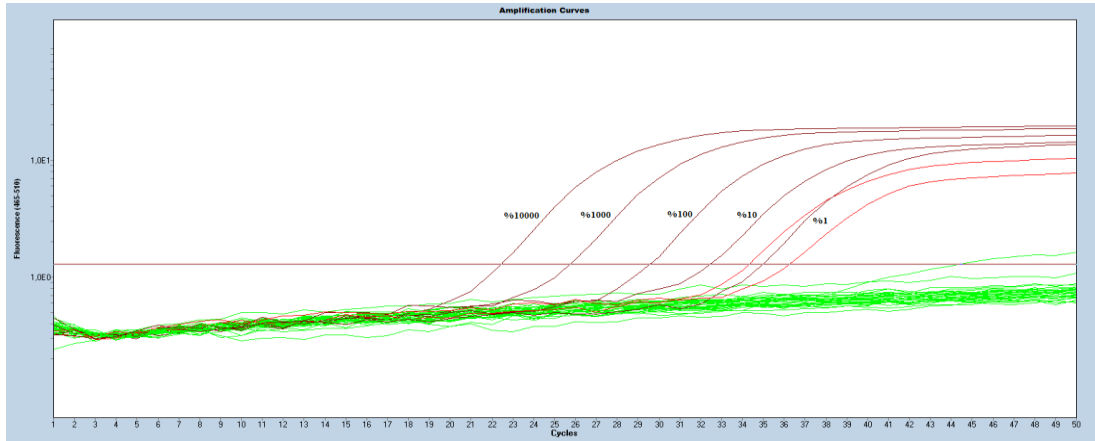
Şekil 4- 3. %100 metile standart ve dilüsyonlarında *ACTB* ve *GYPC* genlerine ait standart eğri.

OSCC hastalarının *GYPC* geni için tümör ve eşlenik normal dokudaki metilasyon oranları %48 (24/50) ve %44 (22/50) oranında bulunurken serum örneklerinin %12'sinde (6/50) metilasyon gözlemlendi (Şekil 4-4).



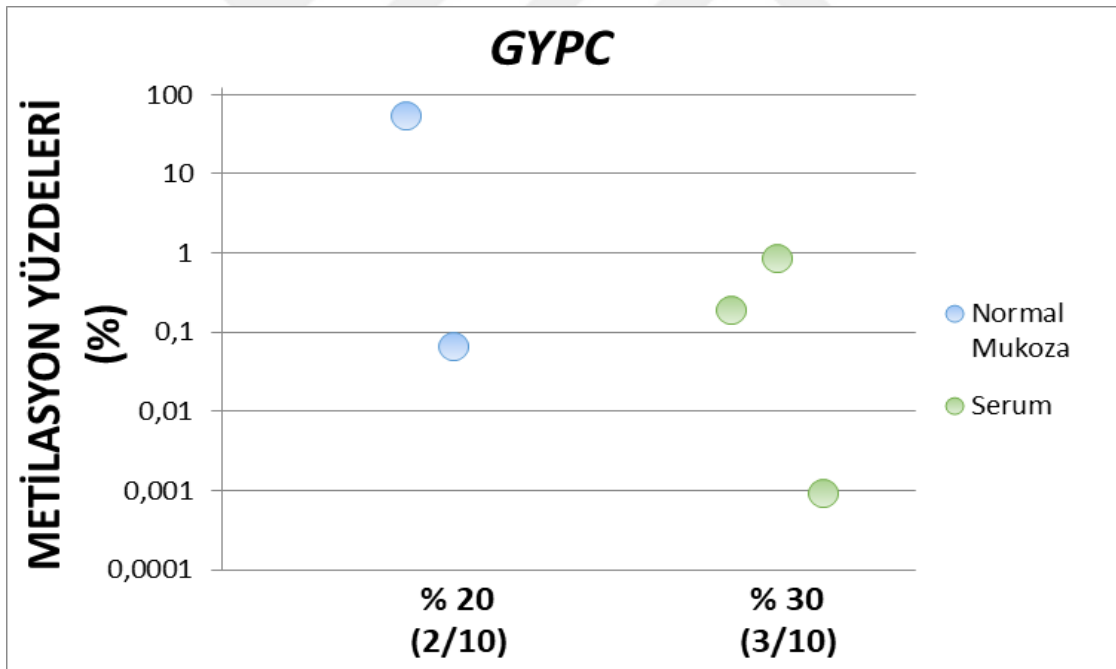
Şekil 4- 4. OSCC hastalarına ait tümör, eşlenik normal ve serum örneklerindeki metilasyon durumu.

Sağlıklı bireylere ait amplifikasyon eğrileri Şekil 4-5'te gösterilmiştir.



Şekil 4- 5. Sağlıklı bireylere ait örneklerde metilasyon durumunu gösteren çoğalma eğrileri.

Sağlıklı bireylerden elde edilen normal mukoz doku ve serum örneklerinde sırasıyla %20 (2/10) ve %30 (3/10) oranında *GYPC* geninin promoter hipermetilasyonu tespit edildi (Şekil 4-6).

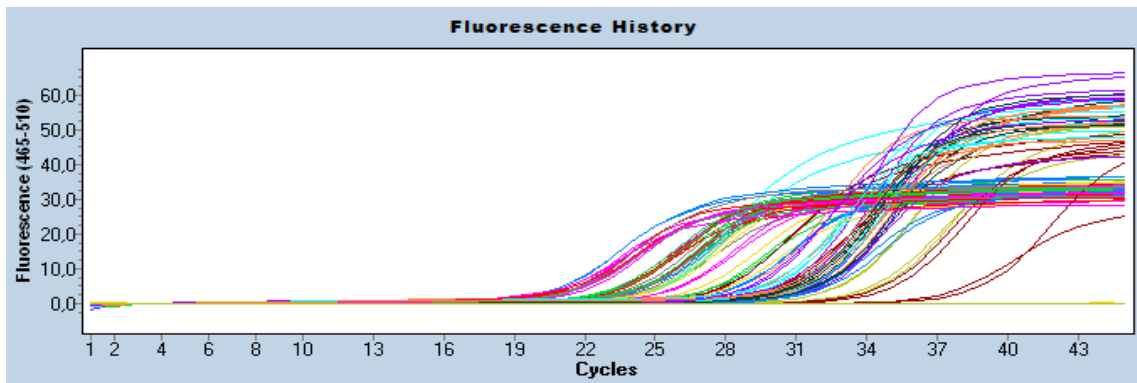


Şekil 4- 6. Sağlıklı bireylerden alınan doku ve serum örneklerinin metilasyon durumları.

4.3. *GYPC* Genin Ekspresyon Analiz Sonuçları

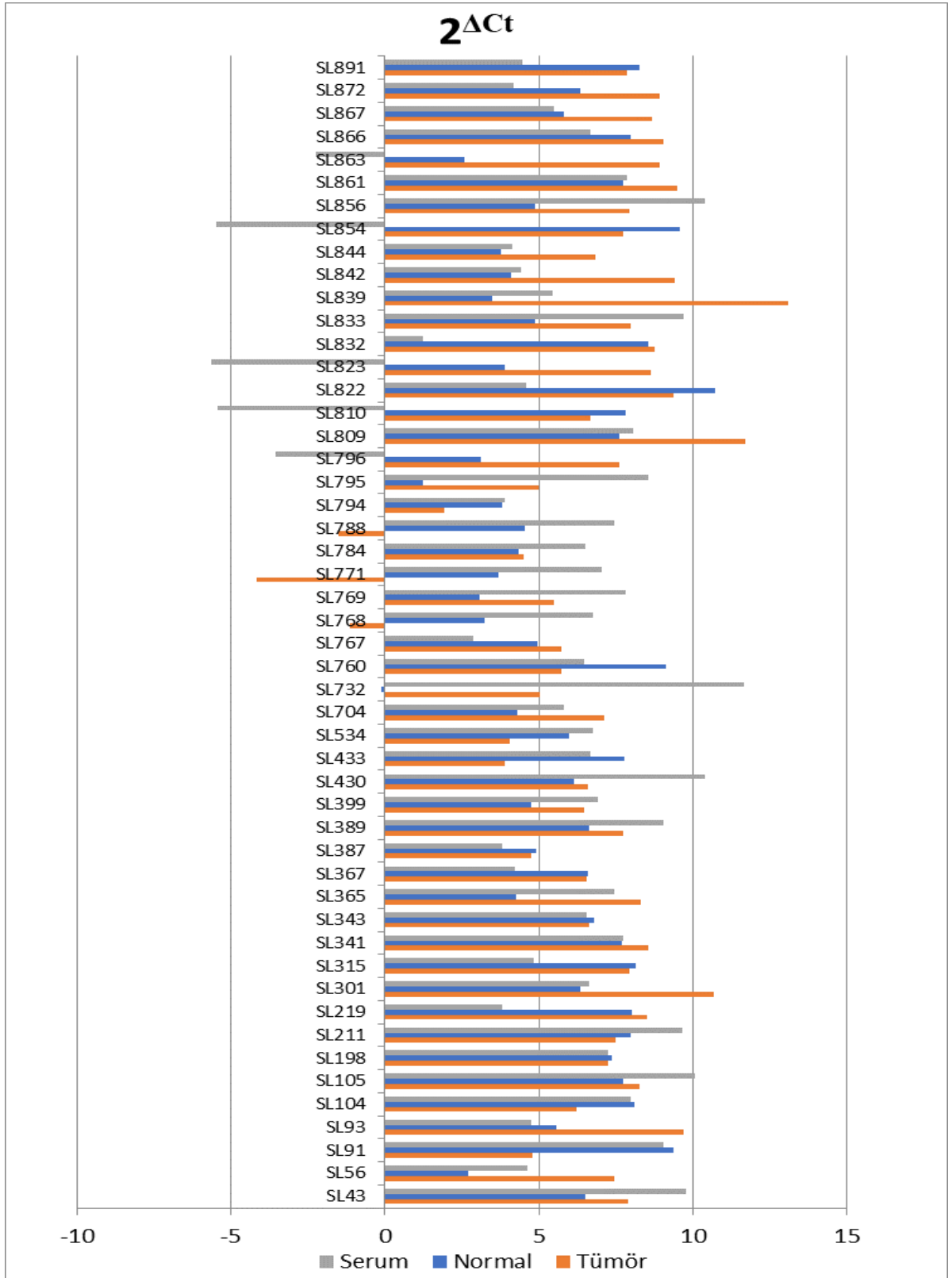
Çalışmamızda OSCC tanısı almış 50 hastaya ait doku (tümör/eşlenik normal) ve serum örnekleri ile 10 sağlıklı bireyin normal doku ve serum örnekleri incelenmiştir.

Hasta ve sağlıklı bireylerden elde edilen örneklerdeki *GYPC* ekspresyon seviyesi SYBR Green içerikli reaksiyon karışımı kullanılarak QRT-PCR tekniği ile incelendi. Deney sonucunda elde edilen referans (*ACTB*) ve hedef gene (*GYPC*) ait C_t değerleri $2^{\Delta C_t}$ değerlerini normali etmek için kullanıldı. Analiz için LightCycler 480 yazılımı içerisindeki Temel Relatif Ölçüm (Basic Relative Quantification) programı ile yapılarak $2^{-\Delta \Delta C_t}$ formülü ile sonuçlar hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre katsayı 2 olarak belirlenmiş olup, bu katsayının altında olan değerler tümör dokusunda eşlenik normal ya da sağlıklı mukozaya oranla ekspresyon azalışı, üstündeki değerler ise ekspresyon artışı olarak değerlendirildi (Şekil 4-7).

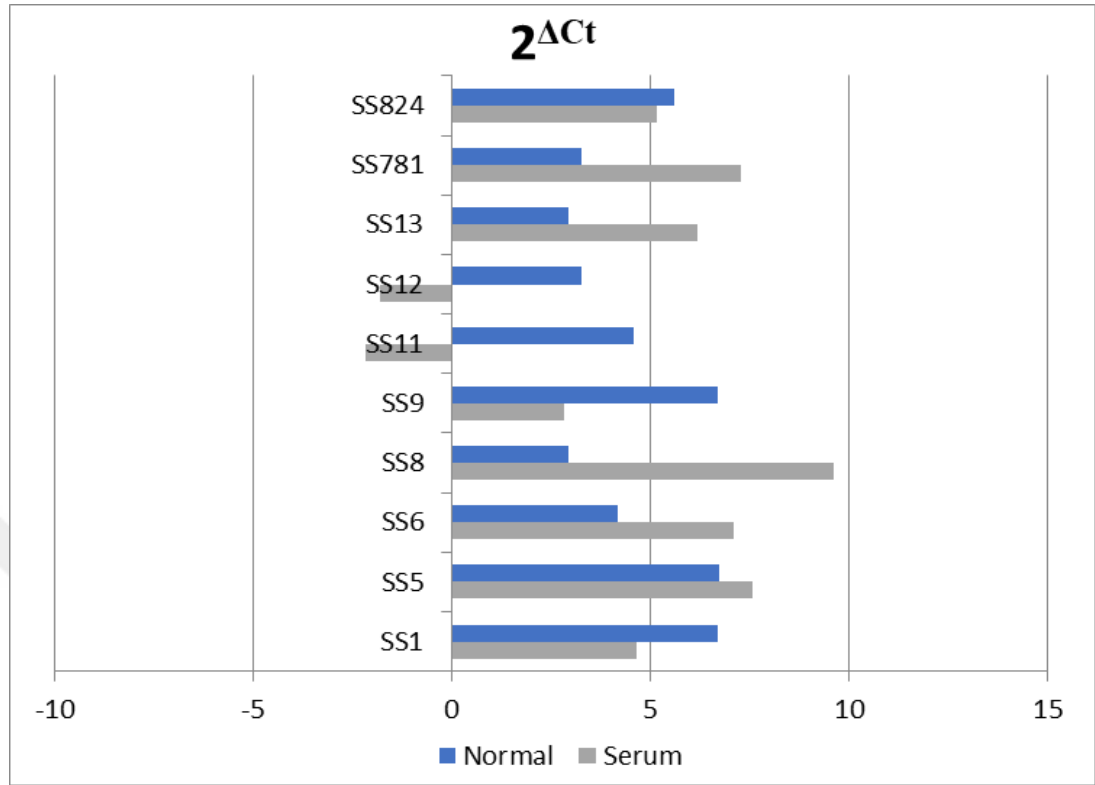


Şekil 4- 7. Tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla *GYPC* ekspresyon seviyesi.

OSCC tanısı alan hastaların tümör ve eşlenik normal dokusu ile sağlıklı bireylere ait normal mukoza dokusunun ekspresyon seviyeleri $2^{\Delta C_t}$ metoduna uygun bir şekilde relatif olarak hesaplandı (Şekil 4-8).



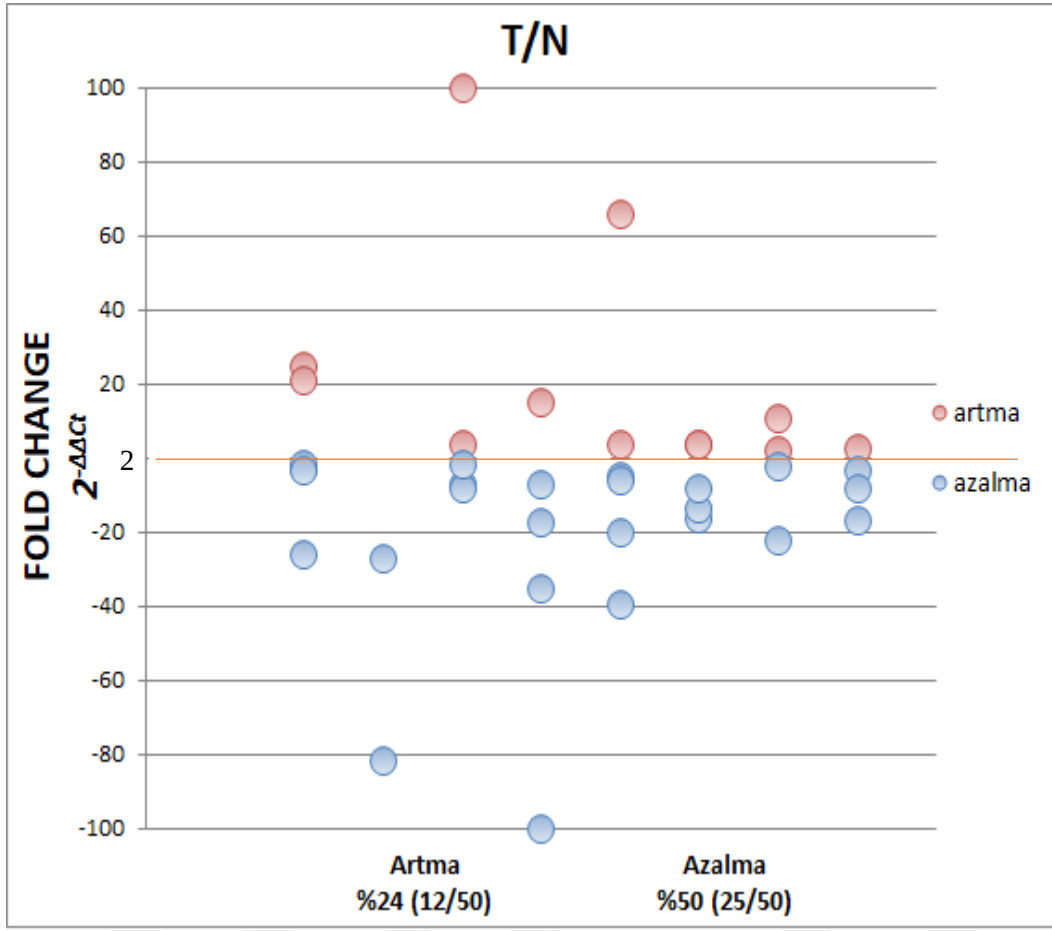
Şekil 4- 8. OSCC hastalarının tümör, eşlenik normal ve serum örneklerinin ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2^{\Delta Ct}$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi.



Şekil 4- 9. Sağlıklı bireylerin sağlıklı normal mukoza ve serum materyallerindeki ekspresyon düzeyleri normalize edilerek $2\Delta C_t$ metodu ile relatif olarak değerlendirilmesi.

Bunun yanı sıra, yine bu iki gruba ait serum örneklerinin ekspresyon düzeyleri de aynı şekilde relatif olarak hesaplandı (Şekil 4-9).

Elde edilen bu $2\Delta C_t$ değerleri hastaların tümör ve eşlenik normal dokularının ekspresyon seviyelerini $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile relatif olarak hesaplamak için kullanıldı (Şekil 4-10). Hastaların %50'inde (25/50) tümör dokusunda eşlenik normal dokuya oranla, ekspresyon seviyesinde azalış gözlenirken, %24'ünde (12/50) ekspresyon seviyesinde artış tespit edildi. Örneklerin %26'ında (13/50) ise ekspresyonda değişim gözlenmedi.



Şekil 4-10. GYPC ekspresyon düzeyleri ile referans genin (β -actin) tümör (T) ve eşlenik normal (N) doku örneklerindeki ekspresyon düzeyleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile relatif olarak hesaplanması.

Hastaların tümör dokularına ait Ct değerlerinin ortalamaları ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarına ait Ct değerlerinin ortalamaları ile kıyaslanarak foldchange değeri hesaplandı ve hastalarda sağlıklı bireylere göre *GYPC* geninin ekspresyon seviyesinde 8 kat azalma tespit edildi. Sadece metilasyon gözlenen hastaların tümör dokularının Ct değerleri ile sağlıklı bireylerin normal mukozalarının Ct değerlerinin ortalamaları karşılaştırılıp foldchange değeri hesaplandı ve metilasyon gözlenen hastalarda 3 kat ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlendi.

Tümör dokusunun eşlenik normal veya normal mukoza dokularına oranla ekspresyon seviyesindeki artış ve azalış durumlarının hastalara ait klinikopatolojik bilgilerle istatistiksel olarak karşılaştırılması için IBM SPSS Statistics 20 programı kullanıldı. Yalnızca ekspresyon seviyeleri ve hastalara ait klinikopatolojik verileri

karşılaştırıldığında cinsiyet, yaş, alkol kullanımı, lenf nodu tutulumu ve anatomik tutulum bölgeleri ile anlamlılık bulunamadı ($p>0,05$). Ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen ile sigara kullanımı hastalar arasında istatistiksel anlamlılığa yakın ilişki gözlenirken ($p=0,077$), metastaz arasında istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ($p=0,006$).

Bunlara ek olarak, anatomik bölgeler ile ekspresyon durumlarının genel durumu Tablo 4-3'te verilmiştir. Ağız tabanında OSCC tanısı konulan hastalar incelendiğinde bu hastaların %87,5'i (7/8) ileri evre (evre III ve evre IV) hastası olduğu tespit edildi.

Tablo 4- 3. Anatomik tutulum bölgelerine göre ekspresyon seviyeleri.

Anatomik Tutulum Bölgesi	Toplam	t/n ekspresyon azalış durumu	t/n ekspresyon artış durumu
	n (%)	n (%)	n (%)
Ağız Tabanı	9(18,0)	4(44,4)	2(22,2)
Bukkal Mukoza	9(18,0)	5(55,5)	2(22,2)
Diğer	18(36,0)	7(38,8)	3(16,6)
Dil	14(28,0)	6(42,8)	4(28,57)

4.4. Metilasyona Bağlı Ekspresyon Seviyesi Değişimi

QMSP ve QRT-PCR sonucu *GYPC* geninde tümör dokusunda metilasyon gözlenen 24 hasta ve ekspresyon azalışı görünen 25 hasta gözlendi (Şekil 4-11). Tümör dokusunda eşlenik dokusuna göre metilasyon gözlenen 24 hastanın 13'ünde metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalış gözlendi.

Tablo 4-4. Metilasyon ve ekspresyon değişikliklerinin gösterimi

HASTA GRUPLARI	Ekspresyon azalış (n=25)	Ekspresyon artış (n=12)	Değişiklik Gözlenmeyen (n=13)
Metilasyon Gözlenen (n=24)	%54,16 (13/25)	%20,83 (5/24)	%25 (6/24)
Metilasyon Gözlenmeyen (n=26)	%46,1 (12/25)	%26,9 (7/26)	%26,9 (7/26)

OSCC hastalarının *GYPC* geni için tümör dokusunda metilasyon gözlenmeyen 26 hastanın %26,9'unda (7/26) ekspresyonda artış, %46,1'inde (12/25) azalma gözlemlendi. Tümör dokusunda metilasyon gözlenen örneklerin %20,83'ünde (5/24) ekspresyonda artış tespit edildi. Buna ek olarak metilasyon gözlenen örneklerin %12,5 (3/24)'ünün serumunda da metilasyon gözlemlendi.

Anatomik bölgelerin metilasyon durumu incelendiğinde dil bölgesinden SCC tanısı konulan hasta grubunun metilasyon oranı %50 (7/14) olarak tespit edildi. Tümör dokusunda metilasyon gözlenen hastalar ile lenf nodu tutulumu ($p=0,011$) ve metastaz ($p=0,044$) arasında istatistiksel anlamlılık gözlemlendi. Tümör dokusunda metilasyon gözlenmeyen fakat eşlenik normal dokusunda metilasyon gözlenen örnekler ile metastaz arasında anlamlılığa yakın sonuç gözlemlendi ($p=0,055$).

Metilasyona bağlı ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastalar ile sigara ($p=0,019$), metastaz ($p=0,019$) ve alkol kullanımı ($p=0,031$) arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir.

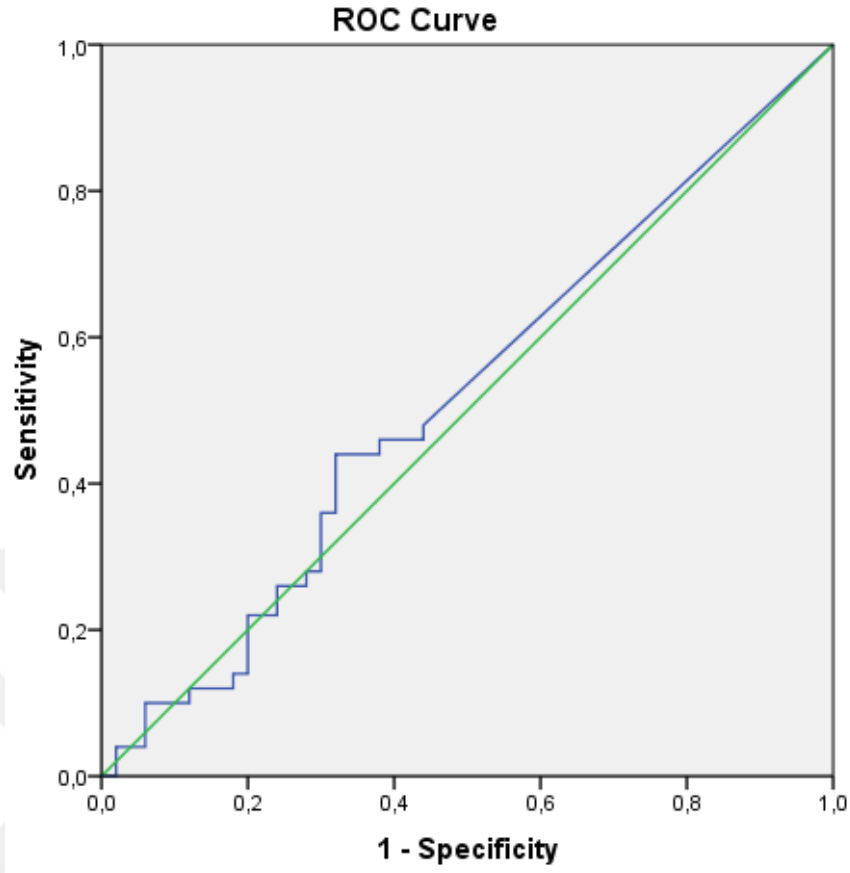
Metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenen hasta grubunun kat değişim oranlarının, metilasyon gözlenip ekspresyon seviyesinde artma gözlenen grubun kat değişim oranlarına göre daha yüksek olduğu bulundu ($p=0,043$).

Metilasyona bağlı ekspresyon seviyelerinde azalma gözlenen hasta grubunun kat değişim oranlarının, metilasyon gözlenmeyip ekspresyon seviyesinde artma gözlenen grubun kat değişim oranlarına göre daha yüksek olduğu bulundu ($p=0,018$).

Ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen hastalarda, metilasyon gözlenen ve metilasyon gözlenmeyen gruplar arasındaki metilasyon yüzdelerinin dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

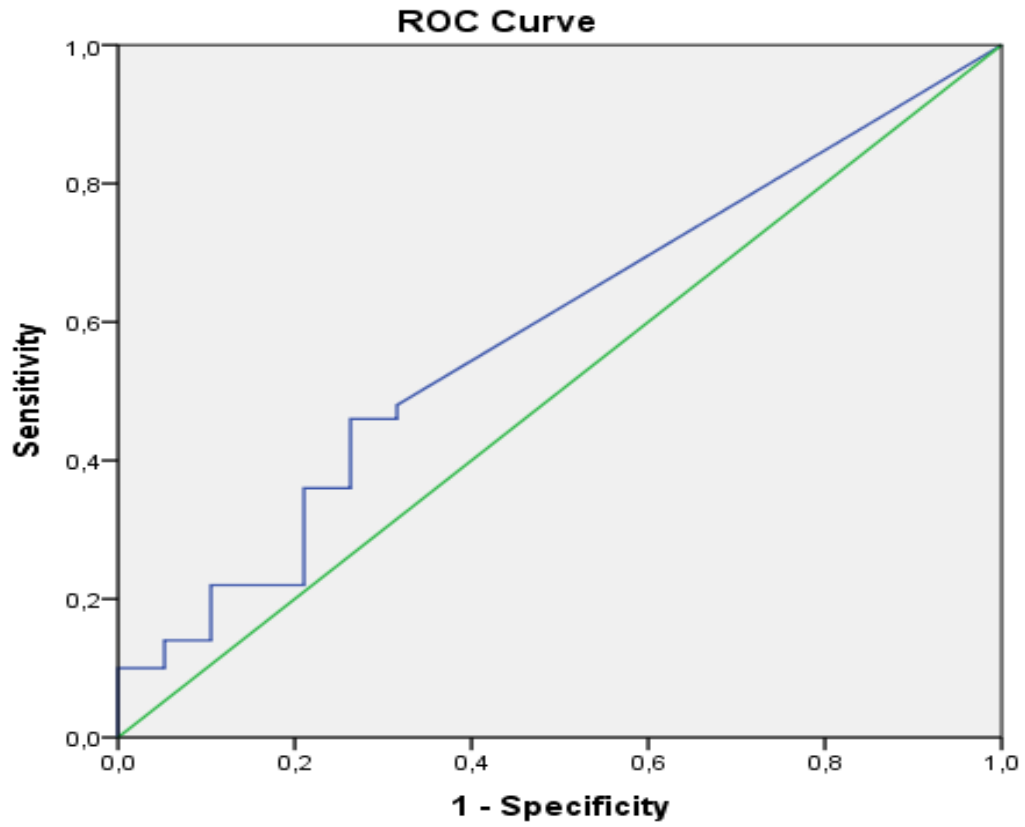
Metilasyon gözlenmeyen hastalarda, ekspresyon seviyesinde artma ve ekspresyon seviyesinde azalma gözlenen gruplar arasındaki kat değişim oranlarında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı ($p>0,05$).

Tümör dokusu ve eşlenik normal doku gruplarında *GYPC* geninin metilasyon seviyeleri ROC analiziyle değerlendirildiğinde, *GYPC* geninin promotor bölgesinde oluşan metilasyonun OSCC hastalarının doku örnekleri aracılığıyla tanı konulmasında %68 özgüllük ve %44 duyarlılık ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi eğri altında kalan ve istatistiksel anlamlılık ifade eden alan (AUC) 0,756'dur. Özgüllük değerinin en yüksek olduğu değer 10 eşik değeri (cut-off point) belirlenebilir (Şekil 4-11).



Şekil 4- 11. Malin grup tümör dokusu ile eşlenik normal dokusu arasındaki GYPC metilasyonunun ROC analizi.

Malin gruba ait tümör dokusu ile sağlıklı grubun normal mukozasındaki *GYPC* geninde gözlenen metilasyon seviyeleri ROC analizi yardımı ile incelendiğinde ise, bu genin promoter bölgesindeki metilasyon seviyesinin OSCC hastalarının dokularında tanı konulması için %73 özgüllük ve %47 duyarlılık ile özgüllüğü yüksek bir test olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4-12’de görülebileceği gibi eğri altında kalan alan (AUC) 0,277’dir. Özgüllük değerlerinin en yüksek değer olduğu 10 eşik değeri (cut-off point) olarak belirlenebilir.



Diagonal segments are produced by ties.

Şekil 4- 12. Malin grup tümör dokusu ile sağlıklı grup normal dokusu GYPC metilasyonunun ROC analizi.

%95 güven aralığında yapılan ANOVA (F-testi) testine göre diffeansiyon derecesi (az-orta-iyi) ve TNM evre (I-II-III-IV) ile *GYPC* geninin ekspresyon seviyesindeki azalma, artış ve metilasyon durumları incelendiğinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmedi ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Tez çalışmamızda oral skuamöz hücreli karsinom tanısı almış 50 hastaya ait tümör/eşlenik normal ve serum örnekleri ile 10 sağlıklı bireye ait doku ve serum örneklerinde *GYPC* geninin promoter metilasyonuna bağlı ekspresyon seviyelerindeki değişimler incelendi. Deneyler sonucunda elde edilen veriler klinik parametrelerle karşılaştırılarak istatistiksel anlamlılıkları araştırıldı. ROC analizi ile *GYPC* geninin OSCC’de tanı ve prognoz için uygun bir biyobelirteç olma durumu araştırılarak bu genin metilasyon seviyesinin malin ve sağlıklı doku arasında %73 özgüllük ve %47 duyarlılık, tümör dokusu ve eşlenik normal doku arasında ise %68 özgüllük ve %44 duyarlılık ile tanı için özgüllüğü yüksek bir test olduğu belirlendi. Literatürde *GYPC*’de meydana gelen ekspresyon değişimleri nörolojik dejenerasyona bağlı hastalıklarda görülmekle birlikte prostat, akut miyeloid, ve akut lenfoblastik lösemi ile ilgili çalışmalara da literatürde rastlanıldı (10, 11, 120, 121, 122).

Zhu ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada, akut miyeloid lösemi (AML) örneklerini FLT3-ITD mutasyonu durumuna göre ArrayExpress, Gen Ekspresyon Omnibus (GEO) ve Kanser Genom Atlas (TCGA) veritabanlarında bulunan ve belirlenen profile (NK: Normal karyotip olmak üzere; 1)FLT3-ITD (+) NK AML ve FLT3-ITD(-) NK-AML 2) FLT3-ITD (+) NK-AML ve FLT3-ITD (-) NK-AML 3) FLT3-ITD (+) AML ve FLT3-ITD (-) AML 4)FLT3-ITD (+) AML ve FLT3-ITD (-) AML) uygun örneklerin gen ekspresyon array sonuçlarını incelenmiş ve Kaplan-Meier analiz sonucuna göre *GYPC* geninde ekspresyon azalışının tanı veya tedavide biyobelirteç olarak kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu bildirmiştir (p=0.015) (10).

Zhu’nun çalışmaları istatistik temelli analiz çalışmaları olup, herhangi bir canlı materyal üzerinde çalışmayıp veritabanlarından elde edilen sonuçlara göre yorumlanarak ortaya konulurken, çalışmamızda hasta ve sağlıklı gruba ait doku ve serum örneklerinde bu genin ileri validasyonu amacıyla çalışılarak sonuçlar ortaya konulmuştur. Ngo ve arkadaşları, akut miyeloid lösemi (AML) tanısı alan 13 vakanın kemik iliğinden alınan biyopsi örneklerini çok serili displazi (multilineage) AML (n=11) ve MDS-AML (n=2; AML’ye dönüşebilme riski bulunan miyodisplastik lezyon) olarak iki gruba ayırarak yalnızca AML-MD örneklerinin ikisinde (2/11) yüksek

konsantrasyonda GYPC gözlemlemiş, hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra mikroskopta 400 kat büyütmede inceleyerek AML-MD ve MDS örneklerinin normal bir eritrosit hücresine göre farklı megaloblast ve nükleus sayısı ile yapısına sahip olduğunu bildirmiştir (121).

Villeval ve arkadaşlarının, kırmızı kan hücrelerinin zarında bulunan yüzey proteinlerinin, eritrositlerin farklılaşmasını iyi karakterize edebilecek bir belirteç olmasından dolayı insan lösemik eritroid ile normal eritroid farklılaşmasını incelemek ve aralarındaki farklılıkları ortaya koymak için gerçekleştirilen çalışmada tek bir sağlıklı bireyden ve akut miyeloid lösemi (AML) tanısı alan 4 hastadan kemik iliği ve kan örneği alınmıştır. Kemik iliğinden izole edilen hücreler May Grünwald-Giemsa ile boyanarak morfolojik değişiklikleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde sağlıklı ve lösemi hücreler arasında blast hücrelerindeki GPC proteinin ekspresyon ve glikozilasyon durumu ile eritroid farklılaşması bakımından farklılıklar bulmuştur. Buna ek olarak kan örneklerinden elde edilen blast hücrelerinde, GPC'nin diğer bir yüzey proteini olan GPA'ya (Glikoforin A) göre daha erken ifade edildiğini ve Northern blot analizi sonucunda bu yüzey proteinlerinden (GPC, GPD, GPA) GPC ve GPD'nin hasta grubunun tamamında (4/4) yüksek konsantrasyona sahip olduğunu bildirerek sağlıklı ve lösemi hücresi arasındaki diferansiyasyon farkını belirlemede belirteç görevi görebileceğini belirtmiştir (124).

Kemik iliğinin, prostat kanserinin en sık görüldüğü metastaz bölgesi olması ve bu bölgedeki metastazı erkenden tespit edip diğer bölgelere yayılmadan önce tespit edilmesi ile ölümcül metastazın önüne geçilebileceği amacıyla gerçekleştirilen bir transkriptom çalışmasında, kemik iliğine metastaz görülen (n=105) ve görülmeyen(n=2) prostat kanseri hastaları ile sağlıklı kontrol için kanser tanısı konulmamış bireylerden kemik iliği (n=18) örnekleri alınarak hücre hatları oluşturulmuştur. Tek hücre (single cell) transkriptom analizi sonucunda GYPC ile birlikte eritroid transkriptlerinin (HBA2 ve SCL4A1) ekspresyonunda sağlıklı kontrole göre bir artış gözlenerek metastaz takibi için bir belirteç adayı olabileceği öne sürmüştür (120). Zhang JB ve arkadaşları GYPC ve TRIP3 gen ekspresyonu ile çocuklarda akut lenfoblastik lösemi (ALL) prognozu arasındaki ilişki ve ALL'nin nüks ile moleküler mekanizmasının anlaşılması için yaptığı çalışmada, akut lenfoblastik lösemi (ALL) tanısı konulan 38 çocuk hasta (hastalardan 31'i tedavi görmüştür ve bunların arasından 12 tanesi nüks göstermiştir) ve kontrol amaçlı, kanser olmayan sağlıklı 20 kan örneği çocuk bireylerden alınarak RT-PCR'da

GYPC ve *TRIP3* geninin ekspresyon durumu incelenerek ALL tanısı konulan hastalardaki *GYPC* ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre artış gösterdiği ($p<0.01$), nüks tespit edilen hastalarda *GYPC* ekspresyon seviyesi, ilk tanı konulduğunda tespit edilen ekspresyon durumuna göre artış gözlenmiştir. Bunun yanında *TRIP3* geninin ekspresyon durumuna bakıldığında, ilk tanıdan sonra belirlenen ekspresyon seviyesi, kontrolle karşılaştırıldığında ekspresyonda azalma gözlenmiş ($p<0.01$), nüks tespit edilen hastaların *TRIP3* geninin ekspresyon seviyesinde, ilk tanıdaki ekspresyon seviyesine göre artış gözlenmiştir. *GYPC* genindeki ekspresyon artışının kötü, yüksek bir *TRIP3* genindeki ekspresyon artışının ise iyi bir prognoz ile ilişkilendirilmiştir (122).

Prostat (120), ALL (121) ve AML (124) çalışmaları hem kullanılan materyal (kemik iliği ve kan) hem de yöntem (protein tayini ve morfolojik değişiklikler) bakımından çalışmamızla örtüşmeyip epigenetik değişikliklerin etkisini incelemezken, yalnızca Zhang JB ve arkadaşlarının (122) yaptığı ALL çalışmasında *GYPC* geninin ekspresyon seviyesinin ölçülmesinde RT-PCR kullanılmış olsa bile çalışmanın altyapısı ve incelenen materyal bakımından çalışmamızdan farklı olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, OSCC tanısı konulan hastaların tümör dokusunda, eşlenik normal dokuya göre %50 (25/50)'sinde *GYPC* geninde ekspresyonda azalma, %24 (12/50)'ünde artış görülürken, ve %26 (13/50)'sında ise ekspresyonda değişim görülmedi. Ekspresyon seviyesinde azalma tespit edilen hastalar ile metastaz arasında istatistiksel anlamlılık bulunurken ($p=0,006$), sigara kullanımı arasında istatistiksel anlamlılığa yakın ilişki gözlenmiştir ($p=0,077$). Literatürde akut lenfoblastik lösemi ve prostat kanserinde *GYPC* geninde ekspresyon artışı görülmesinin nedeni farklı doku tiplerinde, farklı genler ile etkileşimde olmasından kaynaklı olabilir.

Literatürde *GYPC* geninin metilasyon durumunu inceleyen tek bir çalışma mevcuttur (12);

Anormal DNA metilasyonunun tümör oluşumunda, kanserde teşhis ve terapötik hedefleri ayırt etme olaylarında rol oynaması ve bunları belirlemede yüksek verimli (High throughput)DNA metilasyon analizi çalışmalarının, çeşitli kanserler arasındaki epigenetik çeşitliliği kapsamlı şekilde filtreleme imkanı sunması ile Zang C. ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada invaziv meme karsinom, kolon adenokarsinom,renal berrak hücreli tip karsinom,renal papiller hücreli karsinom, akciğer adenokarsinom, akciğer skuamöz hücreli karsinom, rektum adenokarsinom'dan oluşan 7 kanser tipine ait toplam 832 tümör ve 284 eşlenik normal dokusunun

metilasyon array verileri ile 210 tümör ve 68 eşlenik normal dokunun ekspresyon verileri TCGA'dan elde edilerek, metilasyon için 27.578 CpG adacığında 14.475, ekspresyon için ise 20.531 adet gen tespit edilmiştir. Tespit edilen bu genler arasında bir metilasyon korelasyonu ağı oluşturmak için Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) programı kullanılmış, bu korelasyon ağında meme kanseri için belirlenen 509 genin 72'sinde metilasyon görülmüştür. Metilasyon görülen 72 gen için protein-protein ağ analizi yapılarak elde edilen sonuçlara göre meme kanserindeki bir DNA metilasyon korelasyon ağında, GYPC'nin yüksek ve düşük risk gruplarını ayırmada rol oynayabileceği bildirilmiştir ($p=0.036$) (12). Zang C'nin yaptığı bu çalışma literatürdeki verileri birleştirip, işledikten sonra analiz ederek ortaya konulan bir sonuçtur. İncelenen örnekler tümör ve eşlenik normal doku olsa da çalışmada metilasyona bağlı ekspresyon durumunun incelenmemesi ve bunun yanı sıra literatürde başka bir metilasyon çalışmasının bulunmaması bizim çalışmamızın özgün değerini arttırmaktadır. Çalışmamızda OSCC tanısı konulan hastaların doku örnekleri QMSP yöntemi ile incelenerek GYPC geninin tümör, eşlenik normal doku ve serum örneklerinin metilasyon oranları sırasıyla %48 (24/50), %44 (22/50) ve %12 (6/50) olarak tespit edilirken, metilasyon gözlenen örneklerin %12.5 (3/24)'inin serumunda da metilasyon gözlenmiştir. Sağlıklı bireylerin normal mukoz doku ve serum örneklerinde sırasıyla %20 (2/10) ve %30 (3/10) oranında GYPC geninin promoter hipermetilasyonu tespit edildi. Metilasyon gözlenen hastalar ile lenf nodu tutulumu ($p=0,011$) ve metastaz ($p=0,044$) arasında istatistiksel anlamlılık gözlemlendi.

Literatürde, GYPC geninin metilasyona bağlı ekspresyon azalışını inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Metilasyona bağlı ekspresyon azalışı durumunda ise sigara ($p=0,019$), metastaz ($p=0,019$) ve alkol ($p=0,031$) tüketimi arasında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir

Sonuç olarak, GYPC geninde meydana gelen DNA hipermetilasyonun OSCC'de rol oynayabileceği gözlemlendi. GYPC, OSCC tanısında epigenetik bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Singh MP, Kumar V, Agarwal A, Kumar R, Bhatt MLB ve Misra S. Clinico-epidemiological study of oral squamous cell carcinoma: A tertiary care centre study in North India. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 2016; **6**(1), 32-35.
2. Massano J, Regateiro FS, Januário G ve Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006; **102**(1), 67-76.
3. Malik UU, Zarina S, & Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Archives of Oral Biology* 2016; **63**, 53-65.
4. Taghavi N. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Archives of Iranian Medicine* 2015; **18**(5), 317-319.
5. Matejcic M, Gunter MJ, & Ferrari P. Alcohol metabolism and oesophageal cancer: a systematic review of the evidence. *Carcinogenesis* 2017; **38**(9), 859-872.
6. Jones PA ve Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics* 2002; **3**(6), 415.
7. Colin Y. Gerbich blood groups and minor glycoproteins of human erythrocytes. *Transfusion Clinique et Biologique* 1995; **2**(4), 259-268.
8. Walker PS ve Reid ME. The Gerbich blood group system: a review. *Immunohematology* 2010; **26**(2), 60-65.
9. Manichaikul A, Wang XQ, Sun L, Dupuis J, Borczuk AC, Nguyen JN ve ark. Genome-wide association study of subclinical interstitial lung disease in MESA. *Respiratory Research* 2017; **18**(1), 97.
10. Zhu GZ, Yang YL, Zhang YJ, Liu W, Li MP, Zeng WJ ve ark. High expression of AHSP, EPB42, GYPC and HEMGN predicts favorable prognosis in FLT3-ITD-negative acute myeloid leukemia. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2017; **42**(5), 1973-1984.
11. Zhang JB, Li XH, Ning F ve Guo XS. Relationship between expression of gypc and trip3 genes and prognosis of acute lymphoblastic leukemia in children. *Zhongguo dang dai er ke za zhi= Chinese Journal of Contemporary Pediatrics* 2009; **11**(1), 29-32.
12. Zhang C, Zhao H, Li J, Liu H, Wang F, Wei Y ve ark. The identification of specific methylation patterns across different cancers. *PloS One* 2015; **10**(3), e0120361.
13. WORLD HEALTH STATISTICS. Mart 2018. Available from: https://www.tuseb.gov.tr/enstitu/tacese/yuklemeler/istatistik/9789241565585_eng.pdf
14. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2017; **67**(1):7-30.
15. Gültekin M ve Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. *Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu* 2014; 43.

16. Esteller M. Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine* 2008; **358**(11), 1148-1159.
17. Ramadas K, Lucas E, Thomas G, Mathew B, Balan A, Thara S ve Sankaranarayanan RA. Digital manual for the early diagnosis of oral neoplasia. *Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC)* 2008.
18. Montero PH ve Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surgical Oncology Clinics* 2015; **24**(3), 491-508.
19. Vigneswaran N ve Williams MD. Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics* 2014; **26**(2), 123-141.
20. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; **45**(4-5), 309-316.
21. Scully C ve Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases* 2009; **15**(6), 388-399.
22. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M ve Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2011; **23**(8), 633-641.
23. Mehrotra R ve Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer* 2006; **43**(2), 60.
24. Kumar M, Nanavati R, Modi TG ve Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2016; **12**(2), 458.
25. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *Journal of Dental Education* 2011; **65**(4), 328-339.
26. Madani AH, Dikshit M, Bhaduri D, Aghamolaei T, Moosavy SH ve Azarpaykan A. Interaction of alcohol use and specific types of smoking on the development of oral cancer. *International Journal Of High Risk Behaviors & Addiction* 2014; **3**(1).
27. Boffetta P ve Hashibe M. Alcohol and cancer. *The Lancet Oncology* 2006; **7**(2), 149-156.
28. Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncology* 2009; **45**(4-5), 340-350.
29. Reidy J, McHugh E ve Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon* 2011; **9**(5), 278-283.
30. Yete S, D'Souza W ve Saranath D. High-risk human papillomavirus in oral cancer: clinical implications. *Oncology* 2018; **94**(3), 133-141.
31. Ram H, Sarkar J, Kumar H, Konwar R, Bhatt MLB ve Mohammad S. Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery* 2011; **10**(2), 132.
32. Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *Oral Oncology* 2010; **46**(6), 411-413.
33. Marques LA, Eluf-Neto J, Figueiredo RA, de Góis-Filho JF, Kowalski LP, de Carvalho MB ve ark. Oral health, hygiene practices and oral cancer. *Revista de Saude Publica* 2008; **42**, 471-479.
34. Eckert AW, Wickenhauser C, Salins PC, Kappler M, Bukur J ve Seliger B. Clinical relevance of the tumor microenvironment and immune escape of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine* 2016; **14**(1), 85.

35. Jørgen Aarstad H, Heimdal JH, Klementsén B, Olofsson J ve Ulvestad E. Presence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Oto-Laryngologica* 2006; **126**(12), 1326-1333.
36. Bektaş Kayhan, K ve Ünür M. Ağız Boşluğunda Görülen Kanserler Ve Sınıflandırılması/Oral Cavity Cancers and Classification. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry* 2011; **45**(1), 55-63.
37. Conceição Pereira M, Oliveira DT, Landman G ve Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *Journal of the Canadian Dental Association* 2007; **73**(4).
38. Hosseinpour S, Mashhadiabbas F ve Ahsaie MG. Diagnostic biomarkers in oral verrucous carcinoma: a systematic review. *Pathology & Oncology Research* 2017; **23**(1), 19-32.
39. Heera R, Ayswarya T, Padmakumar SK ve Ismayil P. Basaloid squamous cell carcinoma of oral cavity: Report of two cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP* 2016; **20**(3), 545.
40. Thanakappan P venkata NSC, Amudala R ve Botu M. Adenosquamous carcinoma of oral cavity. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2015; **11**(4), 1034.
41. Panda S, Mohanty I, Sahoo A ve Mohanty N. Oral spindle cell carcinoma: A rare lesion masquerading many. *Indian Journal of Public Health* 2018; **9**(11), 1117.
42. Nayak SD, Jose M ve Sequeira J. Oral adenoid/acantholytic squamous cell carcinoma: a report of two cases with review of literature. *Kathmandu University Medical Journal* 2012; **10**(3), 83-87.
43. Ellis MA, Graboyes EM, Day TA ve Neskey D. M. Prognostic factors and occult nodal disease in mucoepidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx: An analysis of the National Cancer Database. *Oral Oncology* 2017; **72**, 174-178.
44. Feller L ve Lemmer, J. Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Journal of Cancer Therapy* 2012; **3**(04), 263.
45. Neville BW ve Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2002; **52**(4), 195-215.
46. Bagan J, Sarrion G ve Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncology* 2010; **46**(6), 414-417.
47. Schiff AB. *Oral Squamous Cell Carcinoma* April 2018, Erişim 07.06.2019, Montefiore Medical Center, The University Hospital of Albert Einstein College of Medicine: <http://msdmanuals.com/professional/ear,-nose,-and-throat-disorders/tumors-of-the-head-and-neck/oral-squamous-cell-carcinoma>
48. Haksever M. Oral kavite kanserlerinde evreleme, prognostik faktörler ve evreleme sistemi üzerine değerlendirmeler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2013; **14**(2), 109-117.
49. *Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer Stages*, Erişim 09.03.2018, <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
50. Ramqvist T ve Dalianis T. An epidemic of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) due to human papillomavirus (HPV) infection and aspects of treatment and prevention. *Anticancer Research* 2011; **31**(5), 1515-1519.

51. Sridharan G. Epidemiology, control and prevention of tobacco induced oral mucosal lesions in India. *Indian Journal of Cancer* 2014; **51**(1), 80.
52. Farris C ve Petite DM. Head, neck, and oral cancer update. *Home Healthcare Now* 2013; **31**(6), 322-328.
53. Hartner L. Chemotherapy for oral cancer. *Dental Clinics* 2018; **62**(1), 87-97.
54. Ribeiro IP, Barroso L, Marques F, Melo JB ve Carreira IM. Early detection and personalized treatment in oral cancer: the impact of omics approaches. *Molecular Cytogenetics* 2016; **9**(1), 85.
55. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology* 2014; **19**(3), 423-430.
56. Dos Santos Costa SF, Brennan PA, Gomez RS, Fregnani ER., Santos-Silva AR, Martins MD ve ark. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: Is it any different from older patients?. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2018; **47**(6), 541-546.
57. Bavle RM venugopal R, Konda P, Muniswamappa S ve Makarla S. Molecular classification of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 2016; **10**(9), ZE18.
58. Choi S ve Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of Dental Research* 2008; **87**(1), 14-32.
59. Perez-Ordenez B, Beauchemin M ve Jordan RCK. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of Clinical Pathology* 2006; **59**(5), 445-453.
60. Kupferman ME ve Myers JN. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngologic Clinics of North America* 2006; **39**(2), 229-247.
61. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP ve ark. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *International Journal of Cancer* 2003; **104**(3), 336-344.
62. Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2018; **47**(9), 803-807.
63. Hanahan D ve Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 2011; **144**(5), 646-674.
64. Gürel Ç, Nursal AF ve Yiğit S. Epigenetik ve Kanser. *Türkiye Klinikleri J Radiat Oncol-Special Topics* 2016; **2**(1), 45-51.
65. You JS ve Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?. *Cancer cell* 2012; **22**(1), 9-20.
66. Sharma S, Kelly TK ve Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; **31**(1), 27-36.
67. Kanwal R, Gupta K ve Gupta S. Cancer epigenetics: an introduction. *Cancer Epigenetics* 2015; 3-25.
68. İzmirli M, Tufan T ve Alptekin D. DNA metilasyonu. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2012; **21**(4), 274-282.
69. Jung SE, Shin KJ ve Lee HY. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Reports* 2017, **50**(11), 546.
70. Audia JE ve Campbell RM. Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2016; **8**(4), a019521.

71. Chen Q, Zhu XY, Li YY ve Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer. *Oncology Reports* 2014; **31**(2), 523-532.
72. Mack GS. Epigenetic cancer therapy makes headway. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; **98**(20), 1443-1444.
73. Peterson CL ve Laniel MA. Histones and histone modifications. *Current Biology* 2004; **14**(14), R546-R551.
74. Sawan C ve Herceg Z. Histone modifications and cancer. *In Advances in Genetics* 2010; **70**, 57-85.
75. Waldmann T ve Schneider R. Targeting histone modifications—epigenetics in cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 2013; **25**(2), 184-189.
76. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Medical Journal* 2009; **50**(4), 455-463.
77. Tyagi M, Khan SA, Bhattacharya S, Reddy D, Sharma AK, Khade B ve Gupta S. Techniques to access histone modifications and variants in cancer. *In Cancer Epigenetics* 2015; 251-272.
78. Yu F, Shen X, Fan L ve Yu Z. Analysis of histone modifications at human ribosomal DNA in liver cancer cell. *Scientific Reports* 2015; **5**, 18100.
79. Adams BD, Kasinski AL ve Slack FJ. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer. *Current Biology* 2014; **24**(16), R762-R776.
80. Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F ve Issartel JP. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Frontiers in Bioscience* 2012; **17**, 2508.
81. Berindan-Neagoe I, Monroig PDC, Pasculli B ve Calin GA. MicroRNAome genome: a treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2014; **64**(5), 311-336.
82. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N ve ark. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:15805–10.
83. Garzon R, Liu S, Fabbri M, Liu Z, Heaphy CE ve ark. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood* 2009; **113**:6411–18.
84. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C ve ark. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Research* 2007; **67**(4), 1424-1429.
85. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell* 2006; **9**:435–43.
86. Toh TB, Lim JJ ve Chow EKH. Epigenetics in cancer stem cells. *Molecular Cancer* 2017; **16**(1), 29.
87. Yodh J. ATP-dependent chromatin remodeling. *DNA Helicases and DNA Motor Proteins* 2013; 263-295.
88. Kumar R, Li DQ, Müller S ve Knapp S. Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene* 2016; **35**(34), 4423.
89. Duex JE, Swain KE, Dancik GM, Paucek RD, Owens C, Churchill ME ve Theodorescu D. Functional impact of chromatin remodeling gene mutations and predictive signature for therapeutic response in bladder cancer. *Molecular Cancer Research* 2018; **16**(1), 69-77.

90. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine* 2018; **243**(3), 213-221.
91. Duffy MJ. Use of biomarkers in screening for cancer. *Advances in Cancer Biomarkers* 2015; 27-39.
92. Costa-Pinheiro P, Montezuma D, Henrique R ve Jeronimo C. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. *Epigenomics* 2015; **7**(6), 1003-1015.
93. Crawford ED ventii K ve Shore ND. New biomarkers in prostate cancer. *Oncology* 2014; **28**(2), 135-42.
94. Reis AH, Vargas FR ve Lemos B. Biomarkers of genome instability and cancer epigenetics. *Tumor Biology* 2016; **37**(10), 13029-13038.
95. Gasche JA ve Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncology* 2012; **8**(11), 1407-1425.
96. Al-Kaabi A, Van Bockel LW, Pothen AJ ve Willems SM. p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Disease Markers*, 2014.
97. Bagan J, Sarrion G ve Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncology* 2010; **46**(6), 414-417.
98. Yalçın E, Süslü N ve Avcu N. Retromolar Trigon Skuamöz Hücreli Karsinom. *Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2014; **24**(3).
99. Bogdanović O ve Lister R. (2017). DNA methylation and the preservation of cell identity. *Current Opinion in Genetics & Development* 2017; **46**, 9-14.
100. Kulis M ve Esteller M. DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics* 2010; **70**, 27-56.
101. Gokul G ve Khosla S. DNA methylation and cancer. *Epigenetics: Development and Disease* 2013; 597-625,
102. Van Tongelen A, Lorient A ve De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer letters* 2017; **396**, 130-137.
103. Wanga XZ, Gu JL, Gao M, Bian Y, Liang JY, Wen HM ve Wu H. Peperomin E Induces Promoter Hypomethylation of Metastatic-Suppressor Genes and Attenuates Metastasis in Poorly Differentiated Gastric Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2018; **50**(6), 2341-2364.
104. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C ve ark. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology* 2003; **124**(5), 1240-1248.
105. Yoo KH, Park YK ve Chang SG. DNA hypomethylation of interleukin 8 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters* 2013; **5**(1), 39-42.
106. Shirkavand A, Boroujeni ZN ve Aleyasin SA. Examination of methylation changes of VIM, CXCR4, DOK7, and SPDEF genes in peripheral blood DNA in breast cancer patients. *Indian Journal of Cancer* 2018; **55**(4), 366.
107. Sharma A, Albahrani M, Zhang W, Kufel CN, James SR, Odunsi K ve ark. Epigenetic activation of POTE genes in ovarian cancer. *Epigenetics* 2019; (just-accepted).
108. Feinberg AP ve Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer* 2004; **4**(2), 143.
109. Li Y, Liang J ve Hou P. Hypermethylation in gastric cancer. *Clinica Chimica Acta* 2015; **448**, 124-132.

110. Muhammad JS, Khan MR ve Ghias K. DNA methylation as an epigenetic regulator of gallbladder cancer: An overview. *International Journal of Surgery* 2018; **53**, 178-183.
111. Greger V, Debus N, Lohmann D, Höpping W, Passarge E ve Horsthemke B. Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Human Genetics* 1994; **94**(5), 491-496.
112. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ ve Thibodeau, S. N. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Research* 1998; **58**(15), 3455-3460.
113. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E ve ark. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 2000; **92**(7), 564-569.
114. Liu L, Liu C, Fotouhi O, Fan Y, Wang K, Xia C ve ark. TERT Promoter Hypermethylation in Gastrointestinal Cancer: A Potential Stool Biomarker. *The Oncologist* 2017; **22**(10), 1178-1188.
115. Hsu HS, Wen CK, Tang YA, Lin RK, Li WY, Hsu WH ve Wang YC. Promoter hypermethylation is the predominant mechanism in hMLH1 and hMSH2 deregulation and is a poor prognostic factor in nonsmoking lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; **11**(15), 5410-5416.
116. Baylin SB ve Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics* 2000; **16**(4), 168-174.
117. Aoki TA comprehensive review of our current understanding of red blood cell (RBC) glycoproteins. *Membranes* 2017; **7**(4), 56.
118. Winardi R, Reid M, Conboy J ve Mohandas N. Molecular analysis of glycophorin C deficiency in human erythrocytes. *Blood* 1993; **81**(10), 2799-2803.
119. Yiangou L, Montandon R, Modrzynska K, Rosen B, Bushell W, Hale C ve ark. A stem cell strategy identifies glycophorin C as a major erythrocyte receptor for the rodent malaria parasite Plasmodium berghei. *PloS one* 2016; **11**(6), e0158238.
120. Denomme GA, Shahcheraghi A, Blackall DP, Oza KK ve Garratty G. Inhibition of erythroid progenitor cell growth by anti-Ge3. *British Journal of Haematology* 2006; **133**(4), 443-444.
121. Gourri E, Denomme GA, Merki Y, Scharberg EA, Vrignaud C, Frey BM ve ark. Genetic background of the rare Yus and Gerbich blood group phenotypes: homologous regions of the GYPC gene contribute to deletion alleles. *British Journal of Haematology* 2017; **177**(4), 630-640.
122. Gužvić M, Braun B, Ganzer R, Burger M, Nerlich M, Winkler S ve ark. Combined genome and transcriptome analysis of single disseminated cancer cells from bone marrow of prostate cancer patients reveals unexpected transcriptomes. *Cancer Research* 2014; **74**(24), 7383-7394.
123. Demokan S ve ark. Promoter methylation and loss of p16(INK4a) gene expression in head and neck cancer. *Head Neck*, 2012. **34**(10): 1470-5
124. Wang D, Seto E, Shu J, Micieli JA, Fernandes BJ ve Denomme GA. Antibody-mediated glycophorin C coligation on K 562 cells induces phosphatidylserine exposure and cell death in an atypical apoptotic process. *Transfusion* 2013; **53**(10), 2134-2140.

125. Lee, B. J., Marchionni, L., Andrews, C. E., Norris, A. L., Nucifora, L. G., Wu, Y. C., ... & Sawa, A. (2017). Analysis of differential gene expression mediated by clozapine in human postmortem brains. *Schizophrenia research*, 185, 58-66.
126. Saito T, Sugiyama K, Hama S, Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R ve ark.. High expression of glypican-1 predicts dissemination and poor prognosis in glioblastomas. *World Neurosurgery* 2017; **105**, 282-288.
127. Ngo N, Lampert IA ve Naresh KN. Bone marrow trephine findings in acute myeloid leukaemia with multilineage dysplasia. *British Journal of Haematology* 2008; **140**(3), 279-286.
128. Villeval JL, Le Van Kim C, Bettaieb A, Debili N, Colin Y, El Maliki B ve ark. Early expression of glycophorin C during normal and leukemic human erythroid differentiation. *Cancer Research* 1989; **49**(10), 2626-2632.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL

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



Sayı : 1119

Tarih : 14.08.2018

Konu: Prof. Dr. Semra DEMOKAN hk.

Sayın Prof. Dr. Semra DEMOKAN
Onkoloji Enstitüsü

İlgi : Onkoloji Enstitüsünün 03/07/2018 gün ve 222947 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Metehan KARATAŞ' ın yürüteceği 2018/1087 dosya numaralı "Oral skuamöz hücreli karsinomda Glycophorin C (GYPC) geninin metilasyon ve ekspresyon seviyelerinin incelenmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 10/08/2018 tarih ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağz ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA GLYCOPHORİN C (GYPC) GENİNİN METİLASYON VE EKSPRESYON SEVİYELERİNİN İNCELENMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 13	% 1	% 1	% 13
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 12
2	Submitted to Yeditepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
3	"Contemporary Oral Oncology", Springer Nature, 2017 Yayın	<% 1
4	www.earticle.net İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.google.com.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Chunping Zhang, Yuli Hao, Yuanyuan Sun, Ping Liu. "Quercetin suppresses the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma by regulating microRNA-22/WNT1/β-catenin axis", Journal of Pharmacological Sciences, 2019	<% 1

Yayın

7	YALUĞ, İrem, ÖZMEN, Mine, TUFAN, Ali Evren and YUMUK, Volkan. "Obezite tedavisi için başvuran hastalarda madde kullanım yaygınlığı ve ilişkili faktörler", TUBITAK, 2005. Yayın	<% 1
8	www.turkmedikal.net İnternet Kaynağı	<% 1
9	etd.lib.metu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
10	www.drsertac.com İnternet Kaynağı	<% 1
11	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
12	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
13	onlinelibrary.wiley.com İnternet Kaynağı	<% 1
14	dosyaism.saglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
15	stacks.cdc.gov İnternet Kaynağı	<% 1
16	"Epigenetics Territory and Cancer", Springer Nature, 2015 Yayın	<% 1

17

repositorio.ufrn.br
Internet Kaynağı

<%1

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Metehan	Soyadı	Karataş
Doğ.Yeri	Samsun	Doğ.Tar.	09.02.1994
Email	metehankaratas9@gmail.com	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2019
Lisans	Ege Üniversitesi	2016
Lise	Atakum Anadolu Teknik Lisesi	2012

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

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

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	-	YDS-73,75

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71,76	66,20	69,75
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
SPSS	İyi
MEGA7	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Satranç, Sinema, Müzik

