

HATİCE ZİŞAN ASAL KILIÇ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021

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

(DOKTORA TEZİ)

**ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA VE RİSK
TAŞIYAN BİREYLERDE PI3K VE WNT SİNYAL
YOLAKLARI İLE İLİŞKİLİ MİRNA VE PROTEİN
BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI**

HATİCE ZİŞAN ASAL KILIÇ

**DANIŞMAN
PROF. DR. NEVİN YALMAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL- 2021

TEZ ONAYI

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



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteğini gördüğüm, hiçbir zaman anlayışını esirgemeyen, değerli bilgi ve görüşlerini benimle paylaşan ve bana yol gösteren saygıdeğer hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Nevin YALMAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Başkanı Sayın Prof. Dr. Fatma Savran Oğuz'a ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sacide Pehlivan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında değerli bilgilerini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Selçuk Dasedemir'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında sağladığı yardım ve destek için tez izleme komite üyelerimden Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Fahri Akbaş'a çok teşekkür ederim.

Tez izleme komite üyelerimden İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hast. AD öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Bora Başaran'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana değerli fikirleriyle katkı sağlayan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Canan Küçükergin'e ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD Öğretim Görevlisi Sayın Dr. İlknur Bingöl'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin istatistiksel verilerinin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet Güven Günver'e teşekkür ederim.

Tez çalışmamın hasta ve kontrol örneklerinin toplanması sırasındaki yardımları için Dr. Dinara Nemetova'ya teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında bana olan sabrı ve sevgisi için canım annem Sare Ölke'ye, bana güç veren kardeşim Süleyman Çağrı Asal'a ve her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim sevgili eşim Ahmet Kılıç'a ve hayatımın neşe kaynağı olan canım oğlum Hüseyin Kılıç'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34946

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom.....	3
2.1.1. OSHK Epidemiyolojisi	3
2.1.2. OSHK Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	4
2.1.3. OSHK Klinik Özellikleri ve Histolojisi	5
2.1.4. OSHK Tanısı ve Evrelemesi	7
2.1.5. OSHK Moleküler Patogenezi.....	10
2.1.6. OSHK Tedavisi ve Prognozunun Takibi	12
2.2. Fankoni Anemisi (FA)	13
2.2.1. FA Epidemiyolojisi	13
2.2.2. FA Etiyolojisi.....	13
2.2.3. FA’sinin Klinik Özellikleri	14
2.2.4. FA Tanısı.....	15
2.2.5. FA Moleküler Patogenezi ve Kanser Gelişim Yatkınlığı	15
2.2.6. FA Tedavisi.....	19
2.3. PI3K Sinyal Yolağı.....	20
2.3.1. PI3K Yapısı ve Fonksiyonu	21
2.3.2. PI3K Sinyal Yolağı ve Kanser İlişkisi	22
2.3.3. OSHK’da PI3K Sinyal Yolağı	24

2.4. Wnt Sinyal Yolağı.....	24
2.4.1. Kaderin İlişkili Protein Beta-1 (Beta-katenin) Yapısı ve Fonksiyonu.....	25
2.4.2. Wnt/ β -katenin (Kanonik Wnt Sinyal Yolağı)	26
2.4.3. Wnt Sinyal Yolağı ve Kanser İlişkisi.....	27
2.4.4. Wnt Sinyal Yolağı ve OSHK	28
2.5. Survivin.....	29
2.6. CIP2A (Kanser İnhibitörü PP2A'nın İnhibitörü).....	29
2.7. MikroRNA'lar (miRNA)	31
2.7.1. miRNA Biyogenezi.....	32
2.7.2. miRNA Aracılı mRNA Baskılanması	33
2.7.3. miRNA'ların Kanser Gelişimindeki Fonksiyonu	34
2.7.4. OSHK ve miRNA'lar	36
2.7.4.1. miR-9.....	36
2.7.4.2. miR-34-a	37
2.7.4.3. miR-196a.....	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grupları	39
3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması ve Saklanması	40
3.3. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri	40
3.4. Cihazlar	41
3.5. Yöntem.....	41
3.5.1. Biyoinformatik Analizler ve Literatür Taraması	41
3.5.2. Tükürük Örneklerinden miRNA İzolasyonu.....	42
3.5.3. İzole Edilen RNA'ların Saflık ve Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	42
3.5.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	43
3.5.5. miRNA'ların Kantitatif SYBR Green PCR Analizleri İçin Kullanılan Primerler	44
3.5.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR).....	44
3.5.7. Kantitatif PCR (qPCR) Sonuçlarının Değerlendirilmesi	46
3.5.8. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Serum Protein Düzeylerinin Ölçülmesi	47
3.5.9. İstatistiksel Analizler.....	50
4. BULGULAR.....	51

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi	51
4.2. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-9, miR-34a ve miR-196a'nın Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi.....	53
4.2.1. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	53
4.2.2. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	56
4.2.3. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	60
4.3. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında Survivin, CIP2A ve β -katenin Proteinlerinin Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	63
4.3.1. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında Survivin Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi	64
4.3.2. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında CIP2A Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi	67
4.3.3. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında β -katenin Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi	71
4.4. OSHK Hastalarındaki miR-9 ve miR-34 Ekspresyon Seviyeleri ile Survivin ve CIP2A Protein Düzeylerinin Birlikte Değerlendirilmesi	75
5. TARTIŞMA	76
KAYNAKLAR	88
FORMLAR	103
ETİK KURUL KARARI	116
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	117
ÖZGEÇMİŞ	118

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: FA Genleri ve Fonksiyonları.....	16
Tablo 3-1: SYBR Green PCR Reaksiyon Karışımı	43
Tablo 3-2: miRNA Primer Dizileri	44
Tablo 3-3: miRCURY LNA RT qPCR Karışımı.....	45
Tablo 3-4: Kantitatif Real Time PCR Koşulları	45
Tablo 3-5: ELISA Kitlerinin Standart Eğri Aralıkları ve Duyarlılıkları.....	48
Tablo 3-6: Survivin ELISA Ölçümleri İçin Standart Solüsyonların Hazırlanışı	48
Tablo 3-7: CIP2A ELISA Ölçümleri İçin Standart Solüsyonların Hazırlanışı.....	49
Tablo 3-8: β -katenin Ölçümleri İçin Standart Solüsyonların Hazırlanışı	49
Tablo 4-1: Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Demografik Verileri.....	51
Tablo 4-2: OSHK Hastalarının Klinik Parametrelerine Ait Veriler	52
Tablo 4-3: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	54
Tablo 4-4: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	55
Tablo 4-5: FA hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	55
Tablo 4-6: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	58
Tablo 4-7: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	59
Tablo 4-8: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	59
Tablo 4-9: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	62
Tablo 4-10: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması.....	62
Tablo 4-11: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması	63

Tablo 4-12: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması	65
Tablo 4-13: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması	65
Tablo 4-14: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması	66
Tablo 4-15: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının CIP2A Düzeylerinin Karşılaştırılması	69
Tablo 4-16: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile CIP2A Düzeylerinin Karşılaştırılması	69
Tablo 4-17: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile CIP2A Düzeylerinin Karşılaştırılması	70
Tablo 4-18: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının β -katenin Düzeylerinin Karşılaştırılması	73
Tablo 4-19: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile β -katenin Düzeylerinin Karşılaştırılması	73
Tablo 4-20: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile β -katenin Düzeylerinin Karşılaştırılması	74
Tablo 4-21: OSHK Hastalarında miR-34a Ekspresyonu ve Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması	75

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: OSHK'un Klinik Özellikleri ve Histolojik Sınıflaması	6
Şekil 2-2: Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda TNM Evrelemesi	9
Şekil 2-3: OSHK Gelişim Aşamaları.....	11
Şekil 2-4: FA'sinde DEB Testi: Kromozom Kırıkları.....	15
Şekil 2-5: PI3K Sinyal Yolağı.	21
Şekil 2-6: Kanserde PI3K/AKT yolundaki değişiklikler	23
Şekil 2-7: Beta-katenin Yapısı.....	25
Şekil 2-8: Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı.....	27
Şekil 2-9: β -katenin'in Hedef Genleri.	27
Şekil 2-10: PP2A ve CIP2A'nın Etkileşim Kurduğu Proteinler.....	30
Şekil 2-11: miRNA Yapısı.....	31
Şekil 2-12: miRNA İsimlendirilmesi.....	32
Şekil 2-13: miRNA Biyogenezi.....	33
Şekil 2-14: miRNA Aracılı mRNA Baskılanması.....	34
Şekil 2-15: Tümör-Süpesör ve Onkogenik miRNA'lar	35
Şekil 2-16: Wnt Sinyal Yolağı Üzerinde Etkili miRNA'lar	35
Şekil 2-17: miR-9 Geninin Kromozomal Lokasyonu ve Baz Dizisi	37
Şekil 2-18: miR-34a Geninin Kromozomal Lokasyonu ve Baz Dizisi	37
Şekil 2-19: mir-196a Geninin Kromozomal Lokasyonu ve Baz Dizisi.....	38
Şekil 4-1: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-9 ekspresyon seviyelerinin grafiği	53
Şekil 4-2: miR-9 ROC Eğrisi.....	56
Şekil 4-3: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-34a ekspresyon seviyelerinin grafiği	57
Şekil 4-4: miR-34a ROC Eğrisi.....	60
Şekil 4-5: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-196a ekspresyon seviyelerinin grafiği	61
Şekil 4-6: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının survivin düzeylerinin grafiği.....	64
Şekil 4-7: Survivin ROC Eğrisi	67

Şekil 4-8: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının CIP2A düzeylerinin grafiği.....	68
Şekil 4-9: CIP2A ROC Eğrisi.....	71
Şekil 4-10: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının β -katenin düzeylerinin grafiği.....	72



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AD: Anabilim Dalı
AGO: Argonat proteini
AKT: Protein Kinaz B
Bcl-2: B-cell Lymphoma 2 proteini
BM: Bazal Membran
BRCA1: Breast Cancer Susceptibility Gene 1
cDNA: Komplementer DNA
CIP2A: Cancerous Inhibitor of PP2A
DEB: Dipeoksibutan
DICER: Dicer 1, ribonükleaz III proteini
dk: dakika
EGFR: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH: Etanol
FA: Fankoni Anemisi
HKHN: Hematopoetik Kök Hücre Nakli
HPV: İnsan Papilloma Virüsü
ILC: DNA çapraz bağları
LNM: Lenf Nodu Metastazı
miRNA: mikroRNA
MMC: Mitomisin C
mTOR: Target of Rapamicin
OD: Optik Densite
OSHK: Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
p53: Hücresel Tümör Antijen p53
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI: İnvazyon Paterni
PI3K: Fosfoinositid-3 Kinaz

PIK3CA: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-Kinaz Alfa

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ

pRB: Retinoblastoma proteini

Pre-miRNA: Öncül mikroRNA

Pri-miRNA: Primer mikroRNA

PTEN: Phosphate and Tensin Homolog Protein

RAD51: Recombination Protein A

RBC: Kırmızı kan hücresi

RISC: RNA Aracılı Susturma

RISC: RNA Induced Silencing Complex

s: saniye

S6K: S6 Kinaz

SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom

snRNA: Small Nuclear RNA

TGF- α : Transforme Edici Büyüme Faktörü- α

TIF: Tumour Invasion Front

TNM: Tümör Boyutu, Lenf Nodu, Metastaz

UV: Ultraviyole

β -Katenin: Beta-katenin

ÖZET

Asal Kılıç, H.Z. (2021). Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda ve Risk Taşıyan Bireylerde PI3K ve Wnt Sinyal Yolakları ile İlişkili miRNA ve Proteinlerin Biyobelirteç Olarak Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) ağız skuamöz epitel hücrelerinden kaynaklanan malign neoplazmdır ve genellikle ileri evrelerde teşhis edilebildiği için kötü prognoz gösterir. 5 yıllık sağ kalım oranı %35-50'dir. Fankoni anemisi (FA) DNA tamir gen mutasyonlarına bağlı gelişen nadir bir kemik iliği yetmezliği sendromudur ve FA hastalarında genel popülasyona göre OSHK daha genç yaşlarda ve sık görülür. OSHK gelişme riski sigara içenlerde de yüksektir. Bu gruplarda gerek tanı, tedavi gerekse prognoz değerlendirmesi için kullanılabilecek biyobelirteçlerin tespit edilmesi önemlidir. PI3K ve Wnt OSHK moleküler patogenezinde rol oynayan önemli sinyal yollarındandır.

Bu tez çalışmasının amacı; OSHK hastaları, FA hastaları ve sigara içenlerde PI3K ve Wnt sinyal yolları ile ilişkili, miR-9, miR-34a, miR-196a'nın tükürük ekspresyon seviyelerinin ve survivin, CIP2A, β -katenin proteinlerinin serum düzeylerinin ölçülmesi ile OSHK açısından biyobelirteçlerin araştırılmasıdır. miRNA ekspresyon seviyeleri kantitatif PCR ile incelenmiştir. miRNA ekspresyon seviyeleri normalize edilerek; OSHK hastaları, FA hastaları ile sigara içen ve sigara içmeyen sağlıklı kontroller arasında karşılaştırılmıştır. Serum protein düzeyleri ELISA ile ölçülmüştür. Çalışmamız OSHK hastaları ve FA hastaları ve sigara içenlerde PI3K ve Wnt sinyal yolları ile ilişkili olabilecek miRNA ve proteinlerin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Verilerimize göre OSHK hastalarında kontrollere göre miR-9 ve miR-34a seviyeleri daha düşük bulunmuştur ($p=0,01$ ve $p=0,012$), miR-196a seviyelerinde anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). OSHK hastalarında miR-9 seviyesi lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur ($p=0,04$). Sigara içen ve sigara içmeyen kontroller arasında miRNA seviye farklılığı belirlenmemiştir ($p>0,05$). FA hastalarında miR-9 ve miR-34a seviyeleri OSHK hastalarındaki gibi kontrollerden daha düşük saptanmıştır ($p=0,017$ ve $p=0,014$). OSHK hastalarında kontrol gruplarına göre Survivin ve CIP2A protein düzeyleri daha yüksek ($p=0,04$, $p=p<0,001$), β -katenin düzeyleri ise düşük bulunmuştur ($p=0,034$). Survivin ve miR-34a seviyeleri arasında negatif korelasyon belirlenmiştir ($p=0,005$). FA hastalarında OSHK hastaları ve sağlıklı kontrollere göre survivin düzeyleri yüksek ($p=0,01$), β -katenin düzeyleri ise düşük saptanmıştır ($p=0,008$). miR-9 ve CIP2A'nın OSHK'da biyobelirteç olarak önemli olabileceği sonucuna varılmıştır. Sigara kullanımının survivin düzeylerini etkilediği görülmüştür. FA hastalarında miR-9, miR-34a, survivin ve β -kateninin seviyelerinin OSHK gelişimi açısından değerlendirilerek takip edilmesi fayda sağlayabilecektir. Hasta sayıları artırılarak çok merkezli sistematik çalışmaların yapılmasının sonuçlarımızı destekleyeceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Oral Skuamöz Hücreli Karsinom, Fankoni Anemisi, miRNA, survivin, CIP2A

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34946

ABSTRACT

Asal Kılıç, H.Z. (2021). Investigation of miRNAs and Protein Biomarkers Associated with PI3K and Wnt Signaling Pathways in Oral Squamous Cell Carcinoma and Risk Groups. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. PhD Thesis. İstanbul.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malign neoplasm originating from mouth squamous epithelium cells, it has poor prognosis as it is usually diagnosed in advanced stages, 5-year survival rate is 35-50%. Fanconi anemia (FA) is a rare bone marrow deficiency syndrome due to the DNA repair gene mutations, and OSCC is seen at younger ages and more frequently in FA patients than in the general population. Tobacco smokers also have risk of developing OSCC. It is important to determine biomarkers which could be used for OSCC diagnosis, treatment, or prognosis evaluation in these groups. PI3K and Wnt are effective signaling pathways in the molecular pathogenesis of OSCC.

The aim of this research is investigation of biomarkers that can be used for OSCC by measuring salivary expression levels of miR-9, miR-34a and miR-196a and serum protein levels of survivin, CIP2A and β -catenin, which are associated with PI3K and Wnt signaling pathways in OSCC patients, FA patients and smokers. miRNA levels were determined with Quantitative PCR. The expression levels of miRNA were normalized and compared between OSCC patients, FA patients, and smoking and non-smoking healthy control groups. Protein levels were determined with ELISA. This is the first study, in which miRNA and proteins which may be related to PI3K and Wnt signaling pathways are being examined among OSCC patients, FA patients and smokers.

According to our data, miR-9 and miR-34a levels in OSCC patients were lower compared to control groups ($p=0,01$ and $p=0,012$), and there was no significant difference in miR-196a levels ($p>0,05$). In OSCC patients, miR-9 level was related to lymph node metastasis ($p=0,04$). The difference in miRNA levels among smokers and non-smokers were not determined ($p>0,05$). In FA patients, miR-9 and miR-34 levels were lower than in control groups, likewise the OSCC patients ($p=0,017$ and $p=0,014$). In OSCC patients, survivin and CIP2A protein levels were determined as higher ($p=0,04$, $p= p<0,001$), but β -catenin levels as lower ($p=0,034$). A negative correlation was observed between the levels of survivin and miRNA-34a ($p=0,005$). In FA patients, survivin levels were higher than OSCC patients and healthy control groups ($p=0,01$), but β -catenin levels were lower ($p=0,008$). miR-9 and CIP2A are important as biomarkers in OSCC. Usage of tobacco was observed to effect survivin levels. In FA patients, close follow up of the levels of miR-9, miR-34, survivin, and β -catenin would be appropriate considering OSCC development. We are of the opinion that, increasing the number of patients and multicentric systematic studies would support our results.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 34946

Key Words: Oral squamous cell carcinoma, Fanconi anemia, miRNA, survivin, CIP2A

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) ağız mukozasının yüzeyindeki çok katlı skuamöz epitel hücrelerinden kaynaklanan malign neoplazmdır. OSHK genellikle geç evrelerde teşhis edilebilmektedir, beş yıllık sağ kalım oranı %50 civarındadır. Hastaların büyük bir yüzdesinde tedaviye yanıt azdır ve nüks oranı yüksektir (Rivera ve Venegas 2014)

Tütün ürünleri ve alkol kullanımı, pre-kanseröz lezyonlar, virüs enfeksiyonları (özellikle HPV), kötü ağız hijyeni, UV, yanlış protetik uygulamalar, demir eksikliği anemisi, A vitamini eksikliği ve bazı genetik sendromlar (Fankoni Anemisi, Bloom Sendromu) OSHK epidemiyolojisinde rol oynayan risk faktörleridir (Rivera 2014). Bu risk faktörleri arasında sigara kullanımı birinci sıradadır (Mehrotra ve Yadav 2006).

Fankoni anemisi (FA) DNA onarım genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanan nadir bir kemik iliği yetmezlik sendromudur (Kutler ve ark. 2012). FA hastalarında OSHK gelişme riski 500-700 kat artmıştır ve genç yaşlarda görülür. Fankoni anemili hastaların 10 yaşından itibaren her 3 ayda bir oral muayene ile taranmaları gerektiği belirtilmektedir (Singh ve ark. 2017).

Genetik ya da epigenetik etkenler aracılığı ile çeşitli sinyal yollarında meydana gelen regülasyon bozuklukları OSHK gelişiminde kritik rol oynar (Hema ve ark. 2017). OSHK moleküler patogenezinde rol oynayan sinyal yolları arasında P53, EGFR, PI3K-AKT, mTOR, MAPK, NF- κ B, GSK-3 β , Wnt/ β -katenin c-Myc yolları ön plana çıkmaktadır (Lakshminarayana ve ark. 2018).

PI3K/(AKT) hücre içi sinyal yolu hayatta kalma, çoğalma, farklılaşma, hücre iskeletindeki değişiklikler, apoptoz, glikoz metabolizması, anjiyogenez gibi temel hücresel süreçlerde etkindir. PI3K yolağının OSHK oluşumundaki etkisine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lien ve ark. 2017). PI3K yolağının aktivasyonu ile görev yapan birçok apoptoz baskılayıcı molekül (Mdm2, Survivin gibi) bulunmaktadır.

Kök hücre çoğalması ve farklılaşmasında etkili olan Wnt yolağı kanserde hücrelerin çoğalması, farklılaşması, invazyon ve metastaz gibi süreçlerde etkindir (Ravindran ve ark. 2015). Wnt yolunun düzensizliği oral karsinogenez ile yakından ilişkilidir. β -katenin oral displazinin OSHK'a malignant dönüşümde rol oynamaktadır

(González-Moles ve ark. 2014). Aynı zamanda OSHK hücrelerinde β -katenin ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Mohamed ve ark. 2007; Zhong ve ark. 2007; Reyese ve ark. 2020).

miRNA'lar 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası ana epigenetik regülatörlerindendir. miRNA'ların mide kanseri, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, glioblastoma, prostat kanseri ve kolorektal kanser, baş ve boyun kanserleri ve OSHK'da sıklıkla anormal şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir (Kinoshita ve ark. 2011). Güncel çalışmalarda miRNA'ların OSHK tanısı, prognozunun takibi, hastanın sağ kalımının ve tedavi yanıtının belirlenebilmesi gibi birçok farklı alanda biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür.

miRNA'lar kan, tükürük, idrar gibi vücut sıvılarında oldukça fazla miktarda bulunmaktadır ve patolojik değişkenlerle yakından ilişkilidir. Birçok kanser türünde vücut sıvılarında serbest dolaşan miRNA'ların sağlıklı kontrollere göre seviye farklılıkları gösterdiği belirtilmiştir (Cao ve ark. 2017).

Tükürük ve serum örnekleri Alzheimer hastalığı, diyabet, pankreas kanseri, Sjögren sendromu, meme kanseri, HIV, Hepatit (A – C), baş-boyun kanserleri gibi birçok hastalıkta biyobelirteç tayanları için kullanılmaktadır. Özellikle tükürük kolay ulaşılabilirliği, yüksek biyomolekül içeriği ve stabilitesi bakımından OSHK biyobelirteç çalışmalarında tercih edilen bir materyaldir (Düz ve ark. 2016; Sannam Khan ve ark. 2016; Mazumder ve ark. 2019).

Çalışmamızda OSHK gelişimde öne çıkan PI3K ve Wnt sinyal yolları ile ilişkili miRNA'lar ve proteinler literatür taramasının yanında, DIANA Tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) ve miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) veritabanları kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada OSHK hastaları ile risk grubunda bulunan FA hastaları ve sigara içen kişilerde; PI3K ve Wnt sinyal yolları ile ilişkili miR-34a, miR-9, miR-196a ile β -katenin, survivin ve CIP2A proteinlerinin incelenmesi ve OSHK için biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinom

Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) ağız tabanı, ağız boşluğu, damak, dudak, dil, faringeal bölgeler ve tükürük bezlerinin etkilendiği tüm neoplazmları kapsayan ağız kanserlerinin %95'ini oluşturur (Choi ve ark. 2008). OSHK dünyada en yaygın görülen 8. kanserdir (>yılda 300000 vaka) ve global bir halk sağlığı sorunudur (Rivera ve ark. 2015).

Terapötik yaklaşımlardaki gelişmelere rağmen, OSHK'nın morbidite ve mortalite yüzdeleri son 30 yılda önemli ölçüde azalmamıştır. Erkeklerde morbidite ve mortalite oranları sırasıyla 6.6/100.000 ve 3.1/100.000 iken, kadınlarda aynı oranlar 2.9/100.000 ve 1.4/100.000'dir (Mehrotra ve ark. 2006). OSHK'lu hastalar için 5 yıllık sağkalım yüzdesi %40-50 arasında değişmektedir. OSHK genellikle geç evrelerde (evre III ve IV) tanı konulan, dolayısı ile tedavi başarısı düşük bir hastalıktır (Centelles ve ark. 2012).

2.1.1. OSHK Epidemiyolojisi

OSHK erkeklerde kadınlara oranla daha yüksek (2:1) görülür, erkeklerde sigara ve alkol gibi risk faktörlerinin tüketimi daha fazladır (Rivera ve Benegas 2014). OSHK için ortalama görülme yaşı 45-50 civarındadır ancak özellikle 18 ila 44 yaş arasındaki beyaz bireyler arasında OSHK insidansı giderek artmaktadır (Petel ve ark. 2011).

OSHK insidansı ve mortalite oranları küresel olarak değişir; Hindistan ve diğer Güney/doğu Asya bölgelerinde (Sri Lanka, Pakistan ve Tayvan), Batı'da Fransa ve Doğu Avrupa'da (Slovenya, Slovakya ve Macaristan), Latin Amerika ve Karayipler (Brezilya, Uruguay ve Porto Riko) ve Pasifik bölgeleri (Papua Yeni Gine ve Melanezya) gibi bölgelerde yüksektir (Rivera ve Benegas 2014). Az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığı fazladır. Özellikle güneydoğu Asya nüfusu çiğnenebilir tütün tüketme kültürel alışkanlığı nedeniyle daha yüksek OSHK oranlarına sahiptir (Iamaroon ve ark. 2004).

Dilin ventral yüzeyi ve ağız tabanı, ince keratinize olmayan epitel yüzeyi ile kaplı oldukları için OSHK'da en sık etkilenen bölgelerdir, bu bölgelerde yüksek oranda karsinojen maruziyeti ve birikimi vardır. OSHK vakaların %20-40'ında dil ve %15-

20'sinde ağız tabanı tutulumu görülür. Daha az etkilenen bölgeler ise gingiva, damak, retromolar alan ve bukkal ve labiyal mukozadır (Feller ve Lemmer 2012).

OSHK'lu kişilerin ortalama 5 yıllık sağkalım oranı, cinsiyet farkı olmaksızın yaklaşık %50'dir; ancak siyah ırkta beş yıllık hayatta kalma oranı diğer ırklara göre daha düşüktür. Yaş, kanserojen alışkanlıkların varlığı (alkol, tütün, çiğnenen tütün kullanımı) veya sosyo-ekonomik durum (yetersiz beslenme) gibi diğer sosyo-demografik faktörler, hayatta kalma oranlarıyla tutarlı bir şekilde ilişkili bulunmamıştır (Warnakulasuriya ve ark. 2009; Centelles ve ark. 2012; Rivera ve Benegas 2014). OSHK sağkalım oranları hastalığı teşhis edildiği evreye bağımlı olarak değişkenlik gösterir, başlangıç evresinde tedavi sonrası sağ kalım %80-90 (Evre I) oranlarında iken, ileri evrelerde sağkalım oranı %30'lara (Evre IV) kadar düşmektedir.

2.1.2. OSHK Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

OSHK etiyojisinde genetik ve epigenetik faktörler rol oynar. Tütün ve alkol kullanımı, beslenme, virüsler, radyasyon, etnik köken, ailesel ve genetik yatkınlık, oral yaralanmalar, immün süpresyon gibi faktörleri OSHK patogenizinde etkilidir.

OSHK için en büyük risk faktörü tütün ve alkol kullanımıdır ve ikisinin birlikte kullanılması riski arttırıcı etkiye sahiptir (Iamaroon ve ark. 2004; Choi ve ark. 2008; Feller ve Lemmer 2012; Rivera ve Benegas 2014). Tütün kullanımı tüm ağız kanseri vakalarının %75'i ile ilişkilidir ve OSHK gelişme riskini 6 kat arttırmaktadır (Markopoulos 2012). Tütün ve alkol kullanımının kombinasyonu, kullanıcılar için OSHK gelişme riski kullanmayanlara kıyasla on beş kat fazladır (Warnakulasuriya ve ark. 2009; Mehrotra ve ark. 2006). Bazı etnik popülasyonlarda kültürel olarak tüketilen çiğnenen tütün (betel sterlini), areca fıstığı, esrar kullanımı gibi faktörler de OSHK gelişim riskini arttırır (Iamaroon ve ark. 2004; Rivera ve ark. 2015).

Sigara içenlerde OSHK gelişme riski, içmeyenlere göre 3 kat daha fazladır (Gandini ve ark. 2008; Marron ve ark. 2010). Sigara içmeyenlerde dumanına maruz kalınması OSHK riskini %85 oranında arttırır (Gandini ve ark. 2008. Rivera ve ark. 2015). Sigara pre-kanserojen olan nitrozaminler, benzopirenler ve aromatik aminleri içerir. Bu bileşikler hem ağız epitel hücrelerine mekanik hasar verir, hem de hücrelerde oksidatif stresi arttırır. Bu stres mutasyonlara ve DNA'da kırıklarına neden olur (Rivera ve ark. 2015).

Benzer şekilde alkol tüketimi de oral mukozanın geçirgenliğini arttırarak ve epitelin lipid bileşenlerini çözerek epitel atrofisine neden olur; aynı zamanda genotoksik ve mutajenik etkilere sahiptir. Alkol aynı zamanda karaciğerin toksik ve kanserojen bileşiklerle başa çıkma yeteneğini etkiler. Alkol ve sigaranın kronik kullanımı immün sistemi zayıflatarak enfeksiyonlara ve neoplazmalara karşı artan duyarlığa yol açar (Markopoulos 2012; Feller ve Lemmer 2012; Rivera ve Benegas 2014).

Diğer risk faktörleri arasında insan papilloma virüsü (HPV) öne çıkmaktadır. HPV16 ağız boşluğu ve faringeal skuamöz hücreli karsinomların (SHK) ve HPV18'i OSHK'un belirgin risk faktörlerindendir. HPV varlığı, lokal olarak ilerlemiş orofaringeal kanserlerde bir prognostik biyobelirteçtir. HPV proteinlerinden E6 tümör süpresör p53'ün, E7 ise pRb'nın (retinoblastoma proteini) yıkımını arttırır. Sonuç olarak hücre döngüsü regülasyonu bozulur (Tanaka ve Ishigamori 2011).

Li Fraumeni sendromu, Plummer-Vinson sendromu, Fanconi anemisi, organ transplantasyonunun kemoterapiye bağlı immünosupresyonu, diskeratoz konjenita, kseroderma pigmentosum ve diskoid lupus eritematozus dahil olmak üzere bir dizi klinik parametre OSHK geliştirme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Feller ve Lemmer 2012; Rivera ve Benegas 2014).

Ultraviyole (UV), A, E veya C vitaminleri veya eser elementlerin eksiklikleri ile immün yetersizlikler diğer OSHK risk faktörleridir.

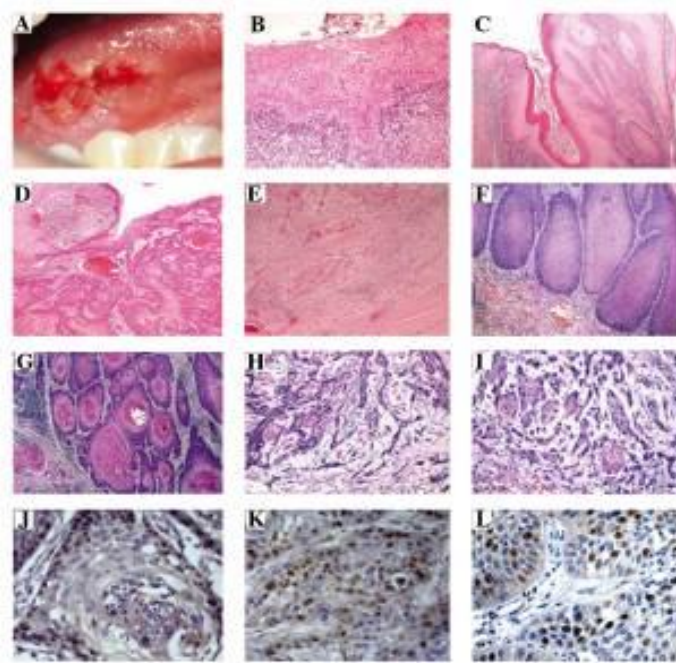
2.1.3. OSHK Klinik Özellikleri ve Histolojisi

OSHK, oral mukozanın çok katlı yassı epitelinden türeyen malign bir neoplazmdır (Tanaka ve Ishigamori 2011). OSHK, histopatolojik ve klinik belirtilerle karakterizedir. Malign lezyonlar histolojik olarak, nihai kanser oluşumuna kadar çeşitli evrelerden (pre-neoplastik hasarlar) geçer. OSHK karsinojenezi pre-kanseröz lezyonlarla (lökoplaki, eritroplaki gibi) ilişkili olabilir (Mehrotra ve ark. 2006; Omura 2014).

Malign neoplazm, en sık dudak ve dilin yan kenarları olmak üzere çeşitli bölgelerde ortaya çıkabilir (Şekil 2.1: A) (Rivera ve Benegas 2014). Karsinogenez sürecinde epitelde bulunan lezyonlar invaziv karsinom oluşumundan önce; histolojik görünümüne göre reaktif epitel değişikliklerine (hiperkeratoz, hiperplazi ve akantoz gibi) veya preneoplastik değişikliklere (hafif, orta ve şiddetli displazi dahil) göre

sınıflandırılır (Şekil.1: B). Ağız kanseri primer olarak epitelyal displazi olarak ortaya çıkar ve epitel tabakasının yüzeyindeki displastik skuamöz hücrelerin artan proliferasyonu ile karakterize edilir. Bu hücreler daha sonra subepitelyal bazal membranı (BM) bozarak invazyon ve metastaza yönelirler. Alttaki dokuya lokal invazyon, epitel hücrelerinin adacıkları ve damarları yoluyla gerçekleşir. Metastaz yapma yeteneği, tümör hücrelerinin farklı dereceleri ile ilişkilidir (Neville ve ark. 2002; Fuentes ve ark. 2012).

OSHK tümör lezyonlarını histolojik olarak sınıflandırmak için iki sistem kullanılmaktadır; Tümörlerin Uluslararası Histolojik Sınıflandırması (Şekil 2.1: C–E) ve TIF (Tumour Invasion Front) modeli. Tümörlerin Uluslararası Histolojik Sınıflandırması tümörün büyüme hızını ve metastaz yapma yeteneğini değerlendirmek için gerekli olan tümör farklılaşma derecesine (kötü, orta ve iyi) göre yapılır (Rivera ve Benegas 2014). TIF sınıflaması ise invazyon derinliği ve çevre dokulara progresyonu olan lezyon alanını kapsar. TIF özelliği gösteren hücreler tümörün yüzeysel bölgelerindeki hücrelere göre farklı moleküler özelliklere sahiptir. TIF, tümörün en temsili alanı olarak kabul edilir ve dört özellik ile tanımlanır; keratinizasyon derecesi, nükleer polimorfizm, lenfositik infiltrasyon ve invazyon paterni (PI) (Kurokawa ve ark. 2005). Tümör hücrelerinin invazyonunun ciddiyetini değerlendirmek için hücrelerin adacıkları ve dışarıya yaptıkları çıkıntılar dikkate alınır (Şekil 2.1: F-I)



Şekil 2-1: OSHK'un Klinik Özellikleri ve Histolojik Sınıflaması

A) Dilin yan kenarında gelişen OSHK B) Displastik epitelin stromal-epitelyal arayüzünde kronik inflamatuvar infiltrasyon ile ilişkili yüzey epitelinin şiddetli displazisi (leke, H&E; büyütme, x50). OSCC'nin tümör farklılaşmasının histolojik dereceleri: C) İyi derecede diferansiye OSHK: hiperkeratoz ve stromal-epitelyal arayüz ile ilişkili inflamasyon; D) orta derecede diferansiye OSHK; E) ön ve çevreleyen doku invazyonu arasında net bir sınır bulunmayan farklılaşmamış infiltre ve dağılmış hücreler (leke, H&E; büyütme, x25). Hücre morfolojisine göre tümör invazyon cephesinde farklı invazyon paternleri (TIF): F) Geniş invazyon cepheleri (skor 1); G) adacık hücre genişlikleri (skor 1); H) ince sızan kordlar (skor 2); ve I) arayüzü istila eden tek tek hücreler (puan 3). J) Nüklü OSHK ve K) Nüksü olmayan OSHK. (Yüksek derecede nükleer boyama ile Ki-67 için antikor boyama (büyütme, ×400). L) HOXB7 ve tip IV kollajen a2 markerları için immünohistokimyasal boyama (Rivera ve Benegas 2014).

OSHK çeşitli klinik formlarda görülür; lezyonlar lökoplaki, verrüköz lökoplaki, eritrolökoplaki veya eritroplakiye benzeyebilir. Bu lezyonlar düzensiz, kabarık, sertleşmiş sınırları olan nekrotik görünümlü bir ülsere veya verrüköz olabilen bir yüzey dokusuna sahip, çakıllı veya pürüzsüz geniş tabanlı bir ekzofitik kitleye dönüşürler., OSHK lezyonları travma sonucunda kolayca kanar ve sıklıkla ikincil enfekte olurlar. OSHK ikincil olarak enfekte olmadıkça genellikle ağrısızdır ancak büyük lezyonlar normal konuşmayı, çiğnemeyi veya yutmayı etkileyebilir (Neville ve ark. 2002; Fuentes ve ark. 2012).

OSHK tanısı genellikle hekimlerin klinik ve patolojik bilgisini gerektirir. Ön tanı sıklıkla diş hekimleri tarafından konulur. Lezyonların klinik ve histopatolojik incelemesine ek olarak; hastanın sağlık durumu, TNM evresi (T, tümör boyutu; N, bölgesel lenf nodu metastazı ve M, uzak metastaz varlığı) ve tümör farklılaşma derecesi terapötik stratejiyi belirleyen faktörlerdir. Ayrıca OSHK prognozunun takibi açısından yararlı patolojik ve moleküler biyobelirteçler (Ki-67, p53, HOXB7 ve tip IV kollajen a2 gibi) tanımlanmıştır (Indborg ve ark. 1997; Kurokawa ve ark. 2005; Choi ve ark. 2008; Rivera ve Benegas 2014).

2.1.4. OSHK Tanısı ve Evrelemesi

OSHK genellikle detaylı bir ağız içi muayane ile teşhis edilebilir. Ağız içinde kansere dönüşme riski olan ya da malign lezyonların varlığı genellikle hekimleri şüphelendirir. Bu aşamada kesin tanı biyopsi ile konulur. OSHK'un detaylı tetkiki için

radyolojik tetkilerden (manyetik rezonans görüntüleme-MR bilgisayarlı tomografi-BT) yararlanılır.

Biyopsi materyallerinin histolojik ve patolojik incelemesi kesin tanı koydurucu yöntemdir (altın standart). Histolojik değerlendirmede lezyonlardaki epitel hücrelerin reaktif değişikliklerine (hiperplazi, hiperkeratoz) ve neoplastik dönüşüm özelliklerine göre incelemeler yapılır ve tümörler iyi, orta ve kötü derecede differansiye (farklılaşmış) olarak sınıflandırılır. İnvazyon paterni, keratinizasyon, nükleer pleomorfizm ve inflamasyon incelemeleri ise tümör lezyonlarının morfolojik değerlendirmelerini kapsar.

OSHK evrelemesi TNM sistemi kullanılarak gerçekleştirilir (Şekil 2.2). TNM evreleme sistemi Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından 1997 yılında hazırlanan ve 2002 yılında son haline güncellenen geleneksel yöntemdir. TNM sistemi; primer tümörün boyutu ve lokal yayılımı (T), lenf nodlarının (boyundaki) boyut ve sayısı (N) ve uzak metastaz (M) olup olmadığı temeli ile oluşturulur. Ancak OSHK için bu geleneksel evreleme yöntemi özellikle prognozun izlenmesinde genellikle yetersiz kalmaktadır. Uygun tedavi yaklaşımının seçilmesi ve prognoz takibi için doğru evreleme gereklidir. Tümörün farklılaşma derecesi, infiltrasyon tipi, invazyon derinliği ve nüks derecesi gibi diğer özelliklerinin değerlendirilmesi kesin tanıyı kolaylaştırır, uygun terapötik yaklaşımın seçilmesine ve prognozun izlenmesine fayda sağlar (Mesquita ve ark. 2014).

Oral kavite kanserleri anatomik yerleşimleri (ağız tabanı, dil, dudak, retromolar üçgen, damak, gingiva) ve histolojik özelliklerine göre ayrı değerlendirilmektedir. İlk muayene ve görüntüleme ile elde edilen bilgiler ile cTNM evre sınıflaması oluşturulur ve tedavi stratejisi seçilir. Erken (I ve II) evredeki ve ileri evredeki (III ve IV) OSHK arasındaki ayrım kritiktir. Hastaya yapılan cerrahi rezeksiyon sonrası tümör histopatolojisi ve/veya bölgesel lenf nodlarından elde edilen patolojik evresi ile belirlenen pTNM evresi postoperatif adjuvan tedavi seçiminde ve prognozu tahmin etmede faydalıdır (Patel ve Shah 2005).

Primer Tümör(T)

Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor
To	Primer tümör yok
T _{is}	in situ karsinom
T ₁	Tümör 2 cm yada daha küçük
T ₂	Tümör 2 cm'den büyük fakat 4 cm'den küçük
T ₃	Tümör 4 cm'den büyük
T4a	Tümör çevre dokuları invaze etmiş (ör., kortikal kemik, derin [eksinensek] dil adeleleri [genioglossus, hiyoglossus, palatoglossus ve stiloglossus], maksiler sinüs , yüz derisi)
T4b	Tümör mastikatör boşluğu, pterigoid kemiği, veya kafa tabanını invaze etmiş ve/veya internal karotid arter tutulumu var

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

Bölgesel Lenf Nodları (N)

N _x	Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
No	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	Tek, ipsilateral, 3 cm yada küçük lenf nodu metastazı
N2a	Tek, ipsilateral, 3 cm 'den büyük 6 cm'den küçük lenf nodu metastazı
N2b	Birden çok, ipsilaterallenf nodu metastazı, hiçbir 6 cm 'den büyük değil
N2c	iki taraflı veya kontralaterallenf nodu metastazı, hiçbir 6 cm 'den büyük değil
N3	Çapı 6 cm'den büyük lenf nodu metastazı

Uzak Metastaz (M)

Mx	Uzak metastaz değerlendirilemiyor
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz

Evreleme Grupları

Evre 0	Tis	NO	M0
Evre I	T1	NO	M0
Evre II	T2	NO	M0
Evre III	T3	NO	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Evre IVA	T4a	NO	M0
	T4a	N1	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
Evre IVB	Her T	N3	M0
	T4b	Her N	M0
Evre IVC	Her T	Her N	M1

Şekil 2-2: Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda TNM Evrelemesi (AJCC, 2002).

OSHK için değerlendirilmesi gereken en önemli durum servikal lenf nodlarıdır. Lenf nodu metastazının (LNM) tek bir tanesi bile sağkalımı %50 oranında etkileyebilmektedir. Bu nedenle lenf nodlarının doğru tedavisi kritik önem taşır (Rivera 2015). İnvazyon derinliği ise OSHK'da en temel prognostik faktördür aynı zamanda LNM için de belirleyici bir histolojik parametredir (Bundgaard ve ark. 2002). Bir diğer önemli prognostik faktör olan tümör derinliği de LNM ile direkt olarak

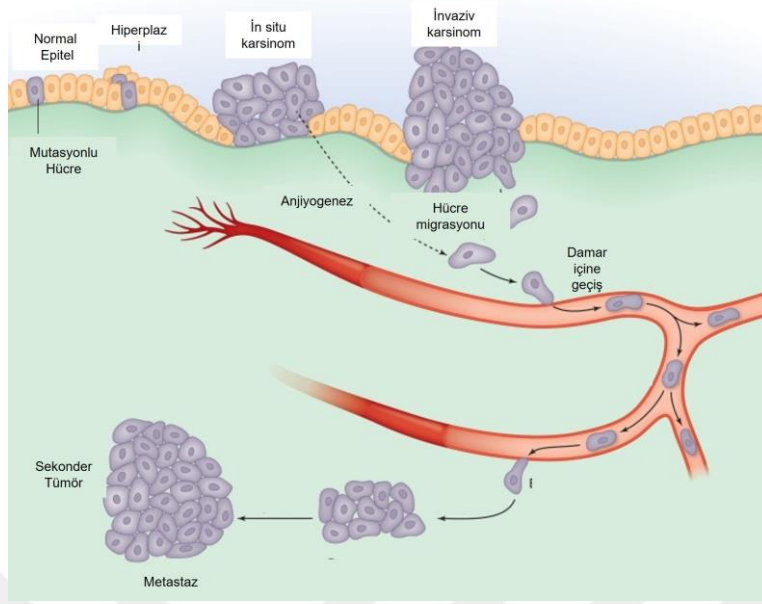
ilişkilendirilmiştir (Wallwork ve ark. 2007). Alttaki dokulara 5 mm'den fazla infiltrasyon olmuş OSHK'ların lenf nodlarına metastaz yapma olasılığı daha yüksektir ve daha kötü prognoz gösterirler (Massano ve ark. 2006).

Dudak, sert damak ve maksiler gingivada görülen SHK, nadiren bölgesel lenf nodlarına metastaz yapar ve iyi prognoz gösterir. Dil ağız tabanı ve mandibular gingivada görülen SHK'lar ise sıklıkla bölgesel lenf nodlarına metastaz yaparlar, daha agresiftirler ve prognozları kötüdür. Genel olarak, oral kavitenin arka kısmındaki SHK'ların bölgesel lenf nodlarına metastaz yapma olasılığı, oral kavitenin ön kısımlarındaki SHK'lara göre çok daha fazladır. Küçük, iyi farklılaşmış, düşük dereceli OSHK'lar genellikle sadece bağ dokusu, kas veya kemiği istila ettikten sonra bölgesel lenf nodlarına metastaz yapar. Öte yandan, kötü farklılaşmış, ileri dereceli OSHK'lar ise daha agresiftir ve hastalığın erken döneminde bölgesel lenf nodlarına metastaz yapma eğilimindedir (Feller ve Lemmer 2012).

2.1.5. OSHK Moleküler Patogenezi

OSHK, bireyin genetik yatkınlığının ve çevresel kanserojenlerin (tütün, alkol, kimyasal kanserojenler, ultraviyole veya iyonlaştırıcı radyasyon ve mikroorganizmalar) birleşik etkilerinden kaynaklanır (Markopoulos 2012). Kanserogenez kronik maruz kalınmasıyla oluşan genetik hasarlar, hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekleyen mutasyonları veya onkogenlerin amplifikasyonunu aktive edebilir. OSHK hücrelerin çoğalma, büyüme kontrolü, farklılaşma veya apoptoz gibi kritik yaşamsal fonksiyonlarını etkileyen genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin neden olduğu kompleks bir hastalıktır.

OSHK'da tipik olarak iyi huylu bir çoğalan hücre grubundan (hiperplaziler) anormal morfoloji, sitolojik görünüm ve hücresel organizasyona sahip bir hücre kütesine progresyon görülmektedir. Bir tümör geliştikten sonra, tümör çekirdeği oksijene ve besin maddelerine erişimi kaybetmekte ve yeni kan damarlarının (anjyogenez) oluşmasına yol açmaktadır. Daha sonra metastaz gelişir; tümör hücreleri dolaşıma geçerek dokuyu normal sınırlarının ötesinde istila eder ve yeni tümörler oluşur (Şekil 2.2) (Giancotti 2014).



Şekil 2-3: OSHK Gelişim Aşamaları.

Genel olarak, OSHK da dahil olmak üzere tüm kanserler, kanserle ilişkili sinyal yollarlarında genetik ve/veya epigenetik değişikliklerin regülasyon bozuklukları meydana getirmesi sonucu gelişir. Bu sürecin sonunda etkilenen hücre ve dokularda kanserin ayırt edici belirteçleri (Hallmarks of Cancer) olarak adlandırılan özellikler (çoğalma sinyalinin devamlılığı, büyüme engelleyici sinyallerden kaçınma, immün sistemden kaçma, devamlı bölünme yeteneği, inflamasyon, invazyon veya metastaz, anjiyogenez, gen mutasyonları, apoptozdan kaçınma, enerji metabolizmasını değiştirme) görülür (Rivera ve Benegas 2014).

Kritik hücresel süreçlerde rol oynayan sinyal yollarındaki ileti farklılıkları OSHK gelişiminin ana oluşum mekanizmasıdır. Genetik ya da epigenetik etkenler aracılığı ile oluşan gen ekspresyon farklılıkları sinyal yollarını doğrudan etkilemektedir. Sinyal ileti mekanizmalarından meydana gelen değişiklikler; tümör baskılayıcı mekanizmaların etkisizleşmesi, onkogenlerin aktivasyonu ve/veya tümör süpresörlerin inaktivasyonu ile hücre büyümesi, farklılaşması, çoğalması ya da apoptoz gibi moleküler biyolojik olayların dengesini etkilemekte ve OSHK'nın moleküler patogenezinde rol oynamaktadır (Hema ve ark. 2017). OSHK moleküler temelinde rol oynayan sinyal yolları arasında P53, EGFR, PI3K-AKT, mTOR, MAPK, NF- κ B, GSK-3 β , Wnt/ β -katenin c-Myc yolları ve bunlarla ilişkili genler ön plana çıkmaktadır (Lakshminarayana ve ark. 2018). Bu sinyal yollarında bulunan örneğin

p16ink4a, p14ARF ve TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve CCND1, RB1, PI3K ve EGFR gibi onkogenik genlerin aktivasyonu OSHK tümör oluşumunda etkilidir. OSHK gelişiminin moleküler düzeyde anlaşılabilmesi için bu sinyal yollarında etkin gen, miRNA ve proteinler büyük öneme sahiptir (Lakshminarayana ve ark. 2018).

Oral epitelin çok çeşitli kanserojen faktörlere sıklıkla maruz kaldığı için; onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin genetik değişikliklerinin birikmesinden kaynaklanan malign lezyonların gelişimi için artmış risk taşıdığı görüşü uzun yıllardır destek görmektedir (Slaughter 1953).

OSHK karsinogenezinde çeşitli onkogenler rol oynamaktadır. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR/c-erb 1), Ras gen ailesinin üyeleri, c-Myc, Int-2, Hst-1, PRAD-1 ve Bcl-1 gibi protoonkogenlerin anormal ekspresyonunun, OSHK gelişimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. p53, p21, mdm2, pRB ve Adenomatous Polyposis Coli (APC) de OSHK ile ilişkili bulunmuş tümör süpresörlerdir (Williams 2000).

2.1.6. OSHK Tedavisi ve Prognozunun Takibi

Cerrahi yaklaşımlar ve radyoterapi OSHK için standart tedavi seçenekleridir, ancak tedavilerdeki gelişmelere rağmen OSHK'un 5 yıllık sağkalımı yıllardır %50 civarlarındadır (Centelles ve ark. 2012). Erken (I ve II) evrelerde tercih edilen tedavi, genellikle kalıcı iyileşme ile sonuçlanan cerrahi ve/veya radyoterapidir. İleri evrelerde (III ve IV) ise cerrahi, radyoterapi veya kemoterapi kombinasyonu kullanılır. Özellikle mukozit, kserostomi ve osteonekroz riski olduğundan, radyoterapi uygulanacaksa ağız bakımı özellikle önemlidir (Feller ve Lemmer 2012).

Genel olarak erken evredeki, iyi diferansiye ve metastaz yapmamış OSHK için prognozun iyi olduğu kabul edilir. Ancak OSHK çoğunlukla geç aşamalarda teşhis edilir ve bu nedenle beş yıllık sağ kalım oranları %15'lere kadar düşebilmektedir. OSHK'un prognozu, tümör, tedavi ve hasta ile ilgili bir dizi faktöre göre değişiklik gösterir. OSHK'da metastazlar %80 oranında servikal lenf nodlarında görülür. Bu olgularda geleneksel olarak servikal lenfadenektomi (radikal boyun diseksiyonu) uygulanmaktadır. Daha yakın zamanlarda, radikal boyun diseksiyonunun morbiditesini azaltmak için selektif boyun diseksiyonu geliştirilmiştir (Zini ve ark. 2010). Özellikle lokal ileri hastalıkta radyoterapinin etkinliğini artırmak için eş zamanlı kemo-

radıyoterapi (CT-RT) uygulanmaktadır. Sisplatin bazlı kemoradyasyon ilerlemiş OSHK için standart seçenektir (Omura 2014). Monoklonal antikorlar ve gen terapisi gibi hedefe yönelik moleküler tedaviler OSHK’da yeni yeni kullanılmaya başlanmıştır. Bu tedavilerin RT ve KT’ye göre avantajı yan etkilerinin sınırlı olmasıdır. Moleküler tedavilerde temel olarak EGFR, Siklooksijenaz-2 (COX-2), Peroksizom Proliferatörü ile Aktive Olan Reseptör y (PPARy) ve Progesteron reseptörü hedef alınmaktadır. Bu moleküller, OSCC'nin proliferasyonu ve farklılaşması ile ilişkilidir

Erken teşhis, OSHK’un başarılı tedavisi için kilit unsur olmaya devam etmektedir. Klinisyenlerin tekli ülserlerin, tümörlerin, kırmızı veya beyaz plaklar gibi bulgular özellikle iki haftadan uzun süredir devam ediyorsa, maligniteden şüphelenmeleri gereklidir. Bu durumlarda şüpheli lezyondan biyopsi alınması uygun yaklaşımdır. Sitolojik yayma ile veya tükürük örneklerinin moleküler analizleri yoluyla OSHK’un erken teşhisinin kolaylaştırılması amaçlanmaktadır (Markopoulos 2012).

2.2. Fankoni Anemisi (FA)

Fankoni Anemisi (FA) otozomal resesif ya da X’e bağlı resesif geçiş gösteren bir kemik iliği yetmezlik sendromudur. FA hastalarında konjenital malformasyonlar, büyüme/gelişim geriliği, çeşitli organ yetmezlikleri ve solid ve solid olmayan tümörlerin gelişimine yüksek yatkınlık görülür (Bagby ve ark. 2006). FA ilk olarak 1927’de Guido Fanconi tarafından bildirilen makrositoz, pansitopeni ve fiziksel anormallikleri olan 3 erkek kardeş ile tanımlanmıştır.

2.2.1. FA Epidemiyolojisi

FA nadir bir hastalıktır, görülme sıklığı dünya çapında ortalama 140 bin kişide 1’dir. Avrupa verileri FA prevalansının milyon canlı doğumda sadece 4-7 olduğunu ortaya koymaktadır. İspanya’nın Roman nüfusu, Aşkenazi Yahudi kökenli insanlar (Amerika’da) ve siyah Güney Afrikalılar arasında FA görülme sıklığı daha yaygındır. FA insidansı, bu gruplarda 45-20 bine kadar düşmektedir. FA heterozigot frekansının ise 1/300 olduğu tahmin edilmektedir. FA vakalarının cinsiyet dağılımları %99 oranında eşittir (Bagby ve ark. 2006 ve Bhandari ve ark. 2021).

2.2.2. FA Etiyolojisi

FA büyük oranda otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır, yaklaşık %2’si ise homozigot veya heterozigot mutasyonlarla X’e bağlı resesif kalıtılır. FA’nde nokta

mutasyonları, duplikasyonlar, ekleme kusurları ve delesyonları kapsayan bir dizi genetik değişiklik taşıyan çeşitli patolojik alleller tanımlanmıştır. FA genlerinin mutasyonları FA DNA tamir yolağında bozulmalara ve yetersiz DNA tamirine neden olur. Bugüne kadar 23'ten fazla FA geni (FANC) tanımlanmıştır (Che ve ark. 2018). Bu genlerin büyük çoğunluğunda otozomal resesif kalıtım görülür ancak X'e bağlı kalıtılan FANCB ve otozomal dominant kalıtılan FANCR (RAD51) gibi istisnalar da görülmektedir (Meetei ve ark. 2002).

2.2.3. FA'sinin Klinik Özellikleri

FA hastalarının klinik bulguları ve özellikleri taşıdıkları mutasyonlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Hastaların %25'inde fenotipte hiçbir anomali görülmez. FA hastalarında sıklıkla görülen anomaliler; progresif kemik iliği yetmezliği ve pansitopeni, büyüme/gelişim geriliği, kraniofasial malformasyonlar, renal ektopi ya da displazi, gastrointestinal malformasyonlar, kardiyak anomaliler, iskelet/el/parmak anomalileri, cilt anomalileri, boy kısalığı, osteoporoz, endokrin bozukluklar, işitme defektleri, fertilité bozuklukları ve VACTERL sendromudur (Bagby 2006).

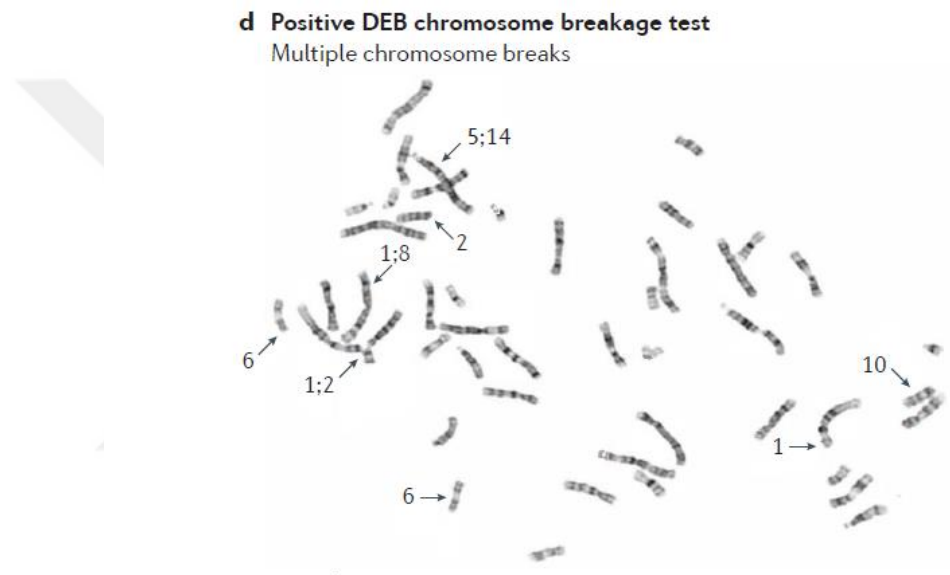
FA kemik iliği biyopsilerinde hipoplazi ve hiposelülarite görülür. FA pansitopeniye yol açar; kırmızı kan hücreleri (RBC'ler), trombositler ve lökositlerde azalma görülür. Trombositopeni nedeniyle burun kanaması, peteşi, yara bölgesinden durdurulamayan kanama öyküsü yaygındır. Ateş ve grip benzeri hastalıkla kendini gösteren lökopeninin şiddeti arttıkça tekrarlayan enfeksiyon riski artar (Bhandari ve ark. 2021).

FA 'de ön plana çıkan patolojilerden biri kanser gelişimine yatkınlıktır. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında FA hastalarında akut miyeloblastik lösemi (AML) normal popülasyondan 500 kat fazla görülürken, myelodisplastik sendrom ve diğer hematolojik malignitelerde de sıklık artmıştır (Kutler ve ark. 2012). Ayrıca bu hastalarda solid tümörlerin (örneğin; baş- boyun, özofagus, cilt, gastrointestinal ve jinekolojik sistem, beyin, meme, akciğer ve karaciğer kanserleri) gelişme riski de oldukça yüksektir. Hematopoetik kök hücre nakli uygulanarak kemik iliği yetmezliği tedavi edilmiş FA hastalarında solid tümörler yaklaşık 50 kat daha sıktır (Nalepa ve Clapp 2018). Günümüzde kemik iliği nakillerinde başarı şansının artması ve yaşam sürecinin uzaması sonucunda FA hastalarında başlıca ölüm nedenleri kanserlerdir.

2.2.4. FA Tanısı

FA tanısında yaygın olarak Diepoksibutan (DEB) testi kullanılır (Şekil 2.4) (Nalepa ve Clapp 2018). FA hücreleri DNA tamir kusurları nedeniyle DNA çapraz bağlayıcı ajanlarına aşırı duyarlılık gösterirler. DEB veya Mitomisin C (MMC) varlığında kültüre edilmiş FA hücrelerinde (T lenfositleri) yoğun kromozomal kırıklar oluşur ve FA tanısı için belirleyicidir.

Ayırıcı tanı için ise hangi FA gen gruplarında mutasyonların olduğunun belirlenmesi için komplementasyon grubu analizi ve mutasyon analizleri uygulanır.



Şekil 2-4: FA 'sinde DEB Testi: Kromozom Kırıkları

2.2.5. FA Moleküler Patogenezi ve Kanser Gelişim Yatkınlığı

FA'nin patogenezi ana mekanizma çift-zincirli DNA'nın homolog rekombinasyon kusurlarıdır. FA DNA tamir yolağındaki FA proteinleri DNA zincirleri arası çapraz bağların (ICL'ler) onarımında etki göstererek genom stabilitesini korurlar. FA yolağı FANC genlerini ve ürünlerini içerir. FA DNA tamir yolağındaki gen defektleri DNA tamirinde yetersizliğe yol açar; genomik toksisiteye aşırı duyarlılığa ve genomik instabiliteye neden olurlar. FA hücreleri MMC, DEB ve sisplatin gibi DNA çapraz bağlayıcı ajanlarına karşı aşırı duyarlılık gösterirler. FA proteinleri ayrıca diğer stres cevap yollarında da görev alır. FA gen mutasyonlarını taşıyan hücreler oksidatif strese ve serbest oksijen radikallerine karşı da yüksek duyarlılıktadır.

Bu güne kadar çok sayıda FANC geni tanımlanmıştır (Tablo 2.1) (Nalepa ve Calpp 2018). FA genleri tarafından kodlanan proteinler, FA DNA tamir yolağında çeşitli fonksiyonlara sahiptir. ICL'lerin oluşumu, FA çekirdek kompleksi düzenlemesine yol açar. Bu kompleksin bileşenlerinden FANCD2 proteini bu yolakta merkezi bir role sahiptir. FANC (A, B, C, E, F, G, L, M) çekirdek proteinleri FANCL bileşenleri olarak tanımlanır. FANCL (E3 ligaz) FANCD2'nin mono-ubikitinasyonunu ve nükleusa translokasyonunu regüle ederler. Mono-ubikitinlenmiş FANCD2 DNA çapraz bağlarının tamirinde görev alır ve BRCA1, FANCD1/BRCA2, RAD51, FANCN/PALB2 gibi diğer DNA tamir proteinleri ile etkileşime girer (Che ve ark. 2018).

FA proteinleri tümör süpresördür bu nedenle FA genlerindeki mutasyonlar, artmış tümör insidansına yol açar. FA yolağı genlerindeki mutasyonlar ya da epigenetik değişiklikler FA sendromuna sahip olmayan kişilerde de kansere neden olmaktadır. BRCA2 (FANCD1) ve BRCA1 (FANCS) geninde meydana gelen mutasyonlar meme kanseri riskini %50'ye kadar, over kanseri riskini ise %15 oranında arttırmaktadır (Nalepa ve Calpp 2018). BRIP1 (FANCI), PALB2 (FANCN) ve RAD51C (FANCO) mutasyonları meme, over ve pankreas kanserleri ile ilişkilendirilmiştir. NIH GDC (National Cancer Institute Genomic Data Commons) portalında listelenen 10.202 kanserin %65'inden fazlasının FA protein genlerinden herhangi birinde en az bir değişiklik (mutasyon, insersiyon veya delesyon) taşıdığını ortaya koymaktadır (Nepal ve ark. 2017).

Tablo 2-1: FA Genleri ve Fonksiyonları

Gen	FA hastalarında yaklaşık insidansı (%)	Moleküler Fonksiyon
FANCA	%60	FA çekirdek kompleksi
FANCB	%2 (X'e bağlı)	FA çekirdek kompleksi
FANCC	%12	FA çekirdek kompleksi
FANCD1(BRCA2)	%2	DNA Tamiri
FANCD2	%2	Mono-ubikitinlenmiş FANCD2 DNA tamir proteinleri ve FANCI ile etkileşir.

FANCE	%2	FA çekirdek kompleksi
FANCF	%2	FA çekirdek kompleksi
FANCG (XRCC9)	%10	FA çekirdek kompleksi
FANCI (KIAA1794)	<%2	FANCD2 ile heterodimer oluşturur. DNA tamir proteinlerini uyarır.
FANCI (KIAA1794)	<%2	DNA helikaz
FANCL (PHF9/POG)	Nadir	E3 ubiquitin ligaz.
FANCM (Hef)	Nadir	FA çekirdek kompleksini bir arada tutar. DNA tamirinde rol alır.
FANCN (PALB2)	Nadir	BRCA1'in lokasyonunu regüle eder.
FANCO (RAD51C)	Nadir	DNA tamir nükleazı
FANCP (SLX4/BTBD12)	Nadir	DNA Holiday junction'ın düzeltilmesi
FANCQ (ERCC4/XPF)	Nadir	DNA tamir nükleazı
FANCR (RAD51)	Nadir	DNA Tamiri, homolog rekombinasyon
FANCS (BRCA1)	Nadir	DNA Tamiri, homolog rekombinasyon
FANCT (UBE2T)	Nadir	FANCD2-FANCI kompleksi ile etkileşir
FANCU (XRCC2)	Nadir	DNA Tamiri, homolog rekombinasyon
FANCV (REV7)	Nadir	Translezyon DNA sentezi

FANCA, FANCC ve FANCG mutasyonları en baskın olarak gözlenen FA gen bozukluklarıdır ve FA hasta vakalarının %80'inden fazlasında görülür. Yapılan çalışmalar FA genlerinin FA gelişimi ve kanser gelişiminde farklı mekanizmalar üzerinden fonksiyon gösterdiklerine işaret eder. Mutasyonlara ek olarak, FA genlerinin kopya sayısı değişiklikleri kanserde yaygın olarak bulunur, yine birçok kanserde FA

proteinlerinin anormal ekspresyonları da saptanmıştır. Hemen hemen her FA geni için fonksiyon değişikliklerinin kazanımı (kopya sayısı artışı ve RNA ekspresyonu artışı) ve kaybının (kopya sayısı kaybı ve mutasyonlar) bir arada bulunması, FA gen ürünlerinin kansere etkisinin çok yönlü olduğunu gösterir. FA yolağı defektleri ve anormal DNA hasar onarımı, genomik instabiliteye neden olur ve tümörlü klonal seçilim için orijin oluşturan mutasyon, delesyon ve translokasyonların birikimi sonucu mutator fenotip ortaya çıkar (Nepal ve Ark. 2017, Nalepa ve Clapp 2018).

FA proteinlerinin DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, genom stabilitesinin korunması, oksidatif homeostaz gibi çok sayıda mekanizmada önemli rolleri vardır ve kanser gelişimini doğrudan ve dolaylı etkiler. Örneğin mesane kanserinde DNA çapraz bağlayıcı ajanlarına karşı yetersiz tamir görülür ve patogenezinde FA yolağında disregülasyon vardır. Yapılan bir çalışmada insan mesane kanseri hücrelerinin metabolik profillemesinde FA yolağında bozukluklar saptanmıştır. FANCL yıkımında etkili FAVL varyantının yüksek olduğu hücrelerde kromozomal instabilite ve tümör gelişimiyle ilişkili metabolitler (metionin, fenilalanin, treonin) yüksek bulunmuştur (Liu ve ark. 2020). Mesane kanseri hücrelerinde FAVL'nin ektopik ekspresyonu, FA hücrelerindeki benzer şekilde defektif bir FA yolağına yol açar ve MMC'ye aşırı duyarlılık oluşturur. FA yolağındaki bozukluklar mesane kanserinin tümörojenik potansiyelini ve progresyonunu artırır. Bu çalışma anormal FA sinyalinin kanser gelişiminde genomik ve fonksiyonel olduğu kadar, metabolik olarak da etkili olduğunu göstermektedir (Panneerselvam ve ark. 2012).

FA hastalarında insidansı en yüksek kanserlerden biri skuamöz hücreli karsinomadır (SHK) (Kuler 2012, Liu ve ark. 2020). Genom stabilitesinin korunmasında görev alan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar kanserde en belirgin mutator fenotiplerden biridir. Yapılan çalışmalar genom stabilitesinin korunmasında etkili FANCD2 ve diğer FA protein genlerindeki defektlerin kanser gelişimi üzerindeki etkisinin, yalnız kalıtsal FA mutasyonlarından değil, çevresel faktörler tarafından tetiklenen spontan mutasyonların artışından da kaynaklanarak gelişebileceğini ortaya koymaktadır. FA hasta popülasyonunda hem kalıtsal hem de çevresel faktörlerce tetiklenen spontan mutasyonların katsayısı yüksektir (Nalepa ve Clapp 2018).

FA olmayan ancak FA yolağında germline mutasyonlar taşıyan bireyler çok sayıda kalıtsal kanserle ilişkilendirilmiştir, FA mutasyonlarının etkileri embriyonik

dönemde görülmeye başlar. Özellikle bazı germline FA mutasyonlarını taşıyan kişilerde meme ve over kanseri yatkınlığı söz konusudur ve bu kişilerin genetik danışmanlık almaları önerilir. FA genlerinde meydana gelen somatik mutasyonlar da çok sayıda kanser ile ilişkilendirilmiştir. İnsan genom projesinde FA hastaları dışındaki kanserlerde FA sinyal yolağındaki (17 FA geni için) bozukluk oranı %30 olarak saptanmış ve tümör evresi yükseldikçe mutasyon oranının arttığı belirlenmiştir (Shen ve ark. 2015). Güncel çalışmalarda da bu bilgileri destekleyen veriler saptanmıştır; FANCD2'nin tümör baskılanmasında rol oynadığı ve malin hücrelerde normal hücrelere göre çok daha düşük oranlarda eksprese edildiği gösterilmiştir (Han ve ark. 2017). FA yolağı proteinlerinin neoplastik transformasyonun başlangıcından itibaren tümör gelişimi üzerinde etkin bir süpresördür. FA yolağı/protein genleri hücre fonksiyonları üzerinde çok yönlü ve kompleks bir göreve sahiptir.

FA hastalarında en sık AML (normal popülasyondan 500 kat fazla) ve diğer hematolojik maligniteler çok sık görülmektedir. Baş -boyun SHK'ları, FA anemisi ile ilişkili önde gelen katı tümörlerdir. FA hastalarının, genel popülasyona kıyasla baş ve boyun kanseri, özellikle OSHK geliştirme olasılığı yaklaşık 700 kat daha fazladır. FA hastalarında sık görülen diğer kanserler serviks, over, meme kanserleri ve hepatoselüler karsinoma (HCC)'dır (Kutler ve ark. 2012).

2.2.6. FA Tedavisi

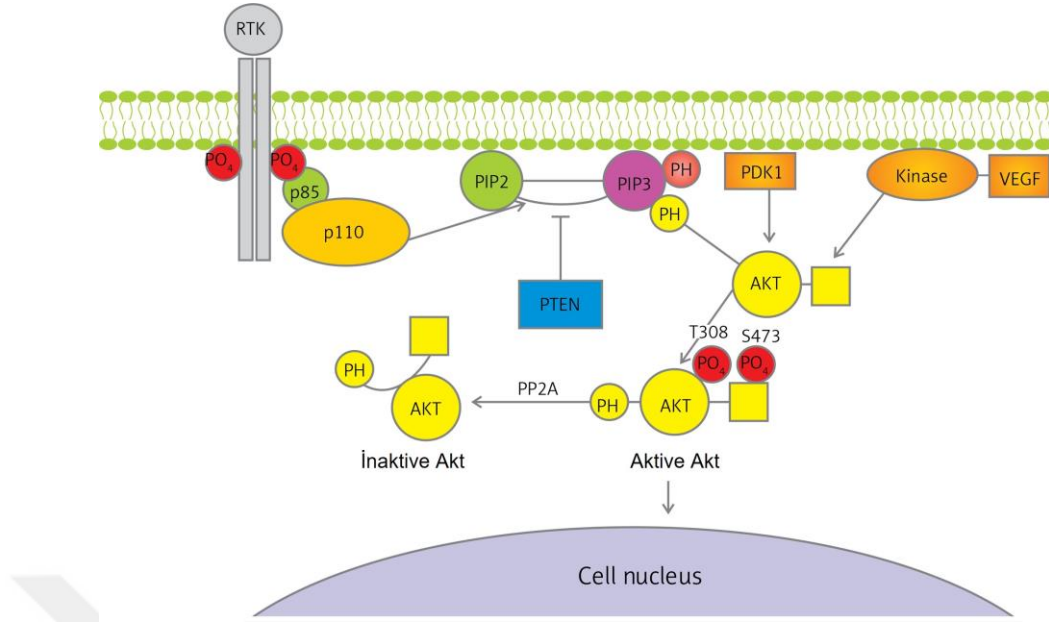
FA tedavisinde tedavi seçenekleri destekleyici tedaviler ve hematopoetik kök hücre transplantasyonudur (HKHT). Kan transfüzyonu FA için en iyi destekleyici tedavidir ve hızlı sonuç verir. FA hastalarına pansitopeniyi gidermek için eritrosit ve trombosit transfüzyonları verilir. Ancak alloimmünizasyon ve graft-versus-host hastalığı nedeniyle aile üyelerinden eritrosit transfüzyonundan kaçınılmalıdır. Lökopeni, granülosit-koloni uyarıcı faktöre (GCSF) iyi bir yanıt verir ancak MNS <200/ml olan hastalar için uygulanmalıdır. Aşırı transfüzyon uygulanması HKHT sonuçlarını olumsuz etkiler. FA hastalarında bir diğer destekliyi tedavi androjen tedavisidir. Oxymetholone (2-5 mg/kg/gün) en sık kullanılan androjendir. Daha az kullanılan diğer androjenler danazol ve oksandrolondur. Androjenler, hematopoetik kök hücre proliferasyonunu uyarır, ancak tedavi edici değildir.

FA için tek etkili ve kalıcı tedavi HKHT'dur. HKHT'u kemik iliği, periferik kan veya kordon kanından yapılabilir. En sık tercih edilen yöntem HLA-uyumlu kardeşten kemik iliği naklidir. FA hastalarına HKHT'dan önce kemoterapi/radyasyon hazırlık rejimleri uygulanır. Kemik iliği yetmezliğinde kemik iliği naklinden sonra erken girişimlerde aşırı rejime bağlı toksisite, greft yetmezliği ve GVHD komplikasyonları gelişebilir ancak son 10 yılda HKHT tedavisindeki başarılar FA hastalarının yaşam sürelerini oldukça yükseltmiştir.

2.3. PI3K Sinyal Yolağı

Fosfoinozotid-3 kinaz (PI3K) ailesi (lipid kinazlar), büyüme ve yaşama sinyallerinin iletiminden sorumlu proteinlerdir. AKT (Protein kinaz B) ise; viral v-akt onkogeninin insanda bulunan ve Akt2 genleri tarafından kodlanan bir formudur. PI3K/Akt sinyal yolağı hücre büyümesi, hücre motilitesi, hücrenin hayatta kalması, insülin yanıtları ve hücre yaşlanmasının düzenlenmesinde rol oynar. PI3K sinyal yolağı yolu kanser gelişimindeki kritik rolü nedeniyle kanser çalışmalarında odak noktalarından biridir. PI3K sinyal yolağı hücre metabolizmasını, tümör büyümesini, sağkalımı ve metastaz gelişimini etkiler (Khan ve ark. 2013). Sitokinler ve büyüme faktörleri PI3K yolağını aktive ederek hücreler için yaşama ve çoğalma sinyalleri oluştururlar.

PI3K sinyal yolağının işleyişi şu şekilde ilerlemektedir (Şekil 2.5) (Starzyńska ve ark. 2021): Tirozin kinaz reseptörünün uyarılmasından sonra PI-3K, hücre membranında inozitol fosfolipidlerin fosforilasyonunu katalizler. Fosfotidilinozitol trifosfat (PIP3), bu yolla oluşan bir lipid mediatördür. PIP3, PIP3 bağımlı kinazlar (PDK) ve Akt (PKB)'nin aktivasyonundan sorumludur. AKT fosforilasyonu, tirozin (T)308 ve serin (S)473 pozisyonunda meydana gelir ve enzimatik aktivitede bin kat artışa neden olur. Buna karşılık, aktive edilmiş AKT proteini, ana hücresel süreçleri etkileyen çoklu proteinleri kodlayan genin transkripsiyonunu başlatır. PIP3 konsantrasyonu PTEN (kromozom 10 üzerindeki fosfataz ve tensin homologue) tarafından fosforilasyonu yoluyla ayarlanır. PTEN bu yolağın negatif regülatörüdür.



Şekil 2-5: PI3K Sinyal Yolağı.

PI3K yolağında aşağı akış (downstream) hedefler Akt aracılığı ile uyarılır. Bu hedeflerden biri memeli rapamisin hedef proteini (mTOR)'dur. mTOR büyüme faktörlerine yanıt olarak translasyonun düzenlenmesini ve hücre çoğalmasını uyarır. mTOR hücrede çok sayıda önemli fonksiyondan sorumludur. mTOR ile ekspresyonu uyarılan 5'TOP mRNA'lar hücredeki RNA miktarının %20'sini oluşturmaktadır ve büyüme faktörleri, onkoproteinler veya hücre döngüsünün düzenleyici proteinlerin translasyonunda etkilidirler. Rapamisin mTOR sentez artışı görülen tümörlerde antitümör etki gösterir (Starzyńska ve ark. 2021).

Akt'nin bir diğer önemli hedefi ise siklin D1'dir ve bu yol üzerinden hücre çoğalması ve sağ kalımı uyarılır (Khan ve ark. 2013).

2.3.1. PI3K Yapısı ve Fonksiyonu

PI3K, fosfatidilinositolün inositol halkasının 3 pozisyonundaki hidroksil grubunu fosforile eden lipid kinazdır. Üç sınıfa ayrılır: I (A ve B), II ve III.

Sınıf IA PI3K, düzenleyici (p85) ve katalitik olmak üzere iki alt birimden oluşan bir heterodimerdir. Katalitik alt birimin üç izoformu vardır: PIK3CA (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim α) geni tarafından kodlanan p110a, PIK3CB (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik alt birim tarafından ifade edilir) geni

tarafından kodlanan p110 β ve PIK3CD (fosfoinositid-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim δ) geni tarafından kodlanan p110 δ (Engelman ve ark. 2006).

Benzer şekilde, düzenleyici alt birimler üç izoformda bulunur ve sırasıyla PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genleri tarafından kodlanan p85 α , p85 β ve p85 γ bu izoformları oluşturur.

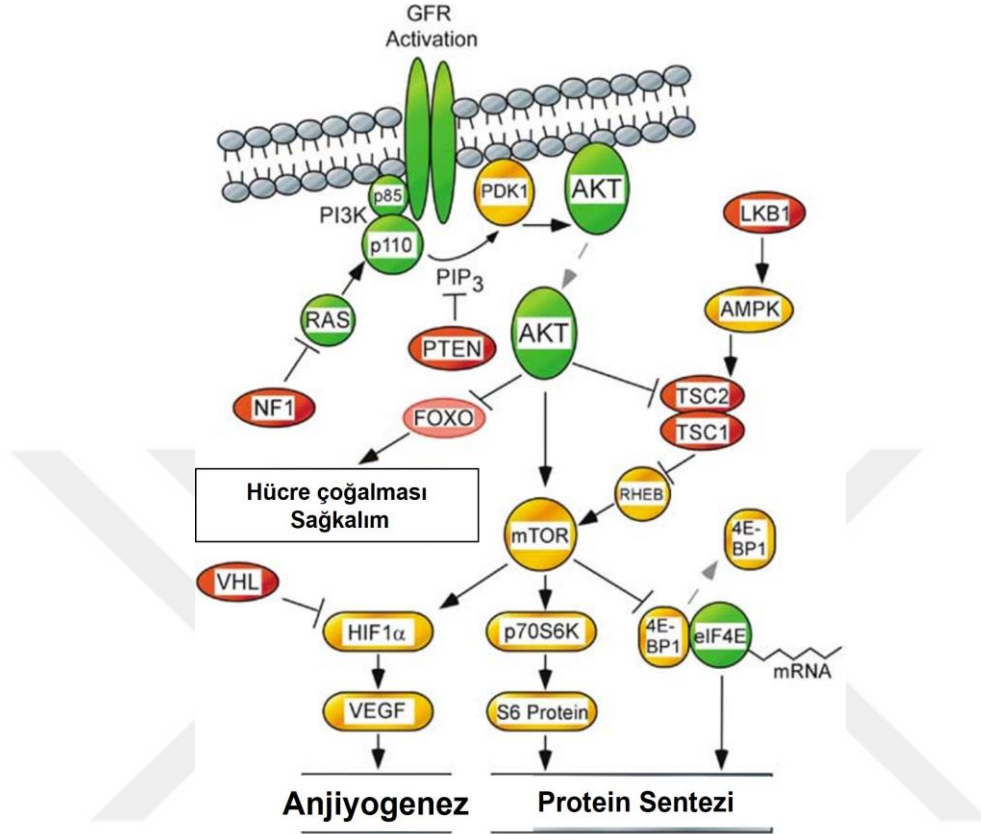
Sınıf IB, katalitik alt birim p110 γ ve düzenleyici 1 – p101 veya onun homolog formları p84 ve p87PIKAP'ten oluşur. IA kinazlar, RTK ile etkileşim yoluyla ve IB, G proteinine bağlı reseptörler tarafından aktive edilir. Sınıf II PI3K'ler, yalnızca üç izoformdan oluşan katalitik alt birim p110'u içerir: PIK3C2 α , PIK3C2 β ve PIK3C2 γ . Sınıf III ise bir Vps34 (vakuolar protein sıralama kusurlu 34) molekülünden oluşur (Engelman ve ark. 2006; Starzyńska ve ark. 2021).

PIK3CA gen değişikliklerinin onkogenik potansiyeli, insüline karşı tümör duyarsızlığı ve dolayısıyla hücrelerde enerji tüketiminin azalması ile ilişkilidir. PIK3CA geninde en yaygın görülen nokta mutasyonları H1047R (ekzon 20), E542K ve E545K (ekzon 9)'dur. PIK3CA geninin amplifikasyonunun neoplastik transformasyona yol açabileceği bilinmektedir (Qiu ve ark. 2006).

2.3.2. PI3K Sinyal Yolağı ve Kansere İlişkisi

PI3K sinyal yolağının düzensiz aktivasyonu meme, over, mide, pankreas, prostat kanserleri gibi birçok kanserle ilişkilendirilmiştir. Özellikle mutasyonlara bağlı olarak gelişen PTEN işlev kaybı (kansere hücrelerinde nokta mutasyonu, delesyon veya epigenetik mekanizmalarla inaktivasyon) nedeniyle mTOR aktivasyonuna neden olan sinyal devamlılığı meydana gelmektedir. Bu aktivasyon p27 gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin de baskılanmasına neden olmaktadır (Nandagopal ve Roux 2015). Akt'ın PI3K yoluyla veya PI3K'dan bağımsız olarak anormal aktivasyonu sıklıkla malignite ile ilişkilidir. Glioblastom, yumurtalık, pankreas ve meme kanserleri dahil olmak üzere birçok kanser türünde Akt izoformlarının gen amplifikasyonunu tanımlanmıştır (Karar ve Maity 2011). Akt uyarısı proapoptotik BAD proteinini aktive ederek kaspaz 9'un inhibisyonunda rol oynar; dolayısı ile apoptozun baskılanmasını teşvik eder ve sağ kalımı artırır. PI3K-Akt yolu aktivasyonu epitel-mezenkimal geçişi (EMT) ve metastazı arttırmaktadır.

Kanserde PI3K sinyal yolağı bileşenlerinin bir çoğunda genetik ve/veya epigenetik değişiklikler meydana gelmektedir (Şekil 2.6) (Karar ve Maity 2011).



Şekil 2-6: Kanserde PI3K/AKT yolundaki değişiklikler. Yeşil proteinler, aşırı ekspresyon ve/veya aktive edici mutasyonları, kırmızı proteinler, kaybı ve/veya inaktivasyonu göstermektedir.

Ligand stimülasyonu, reseptör (örn. EGFR) aşırı ekspresyonu/mutasyonu, onkoproteinlerin aktivasyonu ve Akt sinyal transdüksiyon yolunu kesen tümör supresörlerinin inaktivasyonu kanserlerde PI3K/Akt sinyal yolağını aktive eden mekanizmalardır.

Yeni kan damarlarının oluşumu olan anjiyogeneze, tümör hücrelerinin besinsiz koşullarda hayatta kalması ve büyümesi için genellikle kritiktir. Endotelial hücrelerde VEGF ile aktive olan PI3K/Akt sinyali sağ kalım ve büyümeyi teşvik eder (Starzyńska ve ark. 2021). Akt ayrıca, nitrik oksit (NO) üretimini arttıran endotelial nitrik oksit sentazını (eNOS) aktive ederek; anjiyogeneze katkıda bulunmaktadır. PI3K-Akt yolu üzerinden sinyal vermek, hipoksi ile indüklenebilir faktör α (HIF1 α ve HIF2 α)

transkripsiyon faktörlerinin mTOR yoluyla translasyonunu arttırmaktadır (Karar ve Maity 2011; Nandagopal ve Roux 2015).

Kanser hücrelerinde artan besin ihtiyacını karşılamak için çok sayıda metabolik değişiklik meydana gelir. PI3K-Akt yolu, bu metabolik değişikliklerin oluşması için gereken sinyal iletiminde de rol oynamaktadır. Örneğin glikoz taşıyıcı GLUT1 ve GLUT4'ün Akt2 tarafından uyarılması, kanser hücrelerinde glikoz homeostazı için kritik öneme sahiptir.

2.3.3. OSHK'da PI3K Sinyal Yolağı

PI3K/AKT yolağının OSHK oluşumundaki etkisine dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lien ve ark. 2017). PI3K, AKT, RAS ve PTEN içeren PI3K/AKT yolu ile ilişkili genlerdeki mutasyonlar OSHK ile ilişkili bulunmuştur (Pedrero ve ark. 2005). Aktive edilmiş AKT BAD'ı fosforile ederek apoptoz baskılanmasında rol oynamaktadır. PI3K sinyalinin baş ve boyun kanserlerinde hücre döngüsü ile ilişkili Np63 ve β -katenin gibi proteinlerin ekspresyonunu düzenlemek için FOXO3'ü aktive edebileceğini gösterilmiştir (Kidacki ve ark. 2015). Lenfoid arttırıcı bağlanma faktörü 1 (LEF1), C-MYC ve Cyclin D1 proteinlerinin PI3K yolu ile aktivasyonu invazyon ve metastazda da rol oynadığı bilinmektedir (Yuge ve ark. 2015). PI3K sinyal yolağı kanser gelişiminde apoptozun engellenmesi basamağında da rol almaktadır. PI3K yolağının aktivasyonu ile görev yapan birçok apoptoz baskılayıcı molekül (Mdm2, Survivin gibi) bulunmaktadır.

2.4. Wnt Sinyal Yolağı

Wnt (Wingless) proteinleri ilk kez *Drosophila melanogaster*'de mutant fenotiplerin gözlenmesi ile keşfedilmiş ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur. Wnt proteinleri hücrenin gelişimini ve kendini yenilemesini düzenleyen anahtar sinyal yollarında görev alır. Günümüzde 18 tanımlanmış Wnt proteini vardır. Wnt proteinleri (Wnt ligandları) glikoprotein yapısındadır ve reseptörlerine bağlanarak sinyal iletimini başlatırlar (Ilyas 2005).

Wnt sinyal yolağı embriyonik gelişimi düzenlenmesi, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, sağ kalım, kendi kendini yenileme gibi pek çok hücrel süreçte önemli rol oynar.

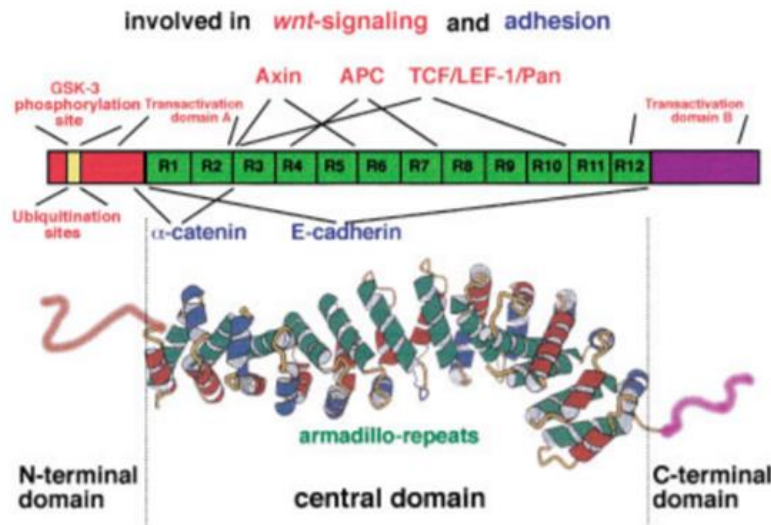
Farelerde INT1 (Wnt1), aktivasyonunun meme hiperplazisi ve tümör gelişimine neden olduğunun belirlenmesi ile, Wnt yolağı kanser ile sıkı bir şekilde

ilişkilendirilmiştir. Kök hücre çoğalması ve farklılaşmasında etkili olan Wnt yolağı kanserde de hücrelerin çoğalması, farklılaşması, invazyon ve metastaz gibi süreçlerde etkindir (Ravindran ve ark. 2015). Wnt yolağının aktivasyonu üzerine, β -katenin sitoplazmada birikir ve sonra çekirdeğe girerek DNA bağlayan TCF transkripsiyon faktörleri ile birlikte c-myc ve siklin D1 gibi genlerin ekspresyonunu uyarır (Altınok ve Sunguroğlu 2016).

Wnt/ β -katenin (Kanonik), Wnt/ Ca^{+2} (Kanonik olmayan) ve Wnt/Planar Hücre Polaritesi (Kanonik olmayan) olmak üzere 3 farklı tip Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır (Huelsenken ve Behrens 2002).

2.4.1. Kaderin İlişkili Protein Beta-1 (Beta-katenin) Yapısı ve Fonksiyonu

Beta-katenin (β -katenin) bir transkripsiyonel regülatördür ve DNA'ya bağlanarak çok sayıda genin ekspresyonunu uyarır. Yapı olarak 781 aminoasit içeri de 92 kDa ağırlığındadır ve üç bölgeden meydana gelir: Central bölge (korunmuş armadillo tekrar dizisi), N-terminal (Gsk-3 fosforilasyon bölgesi) ve C-terminal (Transaktivasyon bölgesi). (Şekil 2.7) (Schneider ve ark. 2003). β -katenin, hücre-hücre adhezyonunda ve gen transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynayan çok fonksiyonlu bir proteindir. İnsanlarda CTNNB1 geni (3p21) tarafından kodlanır. β -katenin, kaderin protein kompleksinin bir alt birimidir ve Wnt sinyal yolunda hücre içi sinyal dönüştürücü olarak görev yapar.



Şekil 2-7: Beta-katenin Yapısı

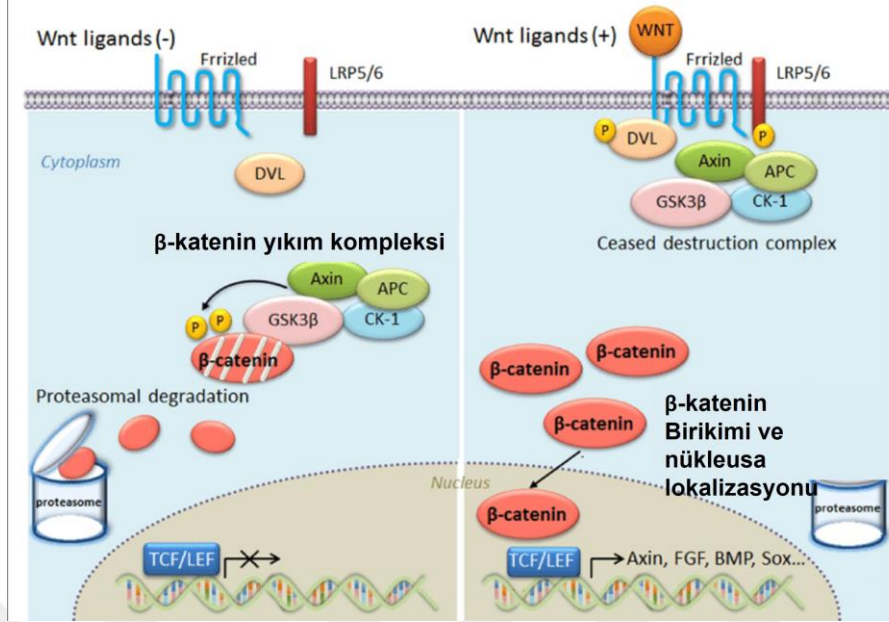
β -katenin (Axin, APC, TCF/LEF1, e-kadherin) gibi birçok protein bağlanarak fonksiyonları üzerinde etki gösterir.

β -katenin sitoplazma, hücre membranı ve nükleusta fonksiyon gösterir. Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedefi hücre zarı, sitoplazma ve çekirdekteki β - katenin seviyesinin ayarlanmasıdır. Membrandaki β -katenin E-kadherin ile kompleks oluşturur. Oluşan E-kadherin/ β -katenin kompleksi hücreler arası bağlantıların ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde etkilidir. E-kadherin/ β -katenin kompleksindeki bozulmalar hücreler arası bağlantıları bozar ve hücrelerin hareketini etkiler. Kanser hücrelerinde bu bozulmalar yoğun şekilde görülür. E-kadherin/ β -katenin bağlantısının bozulması β -kateninin hücre içinde birikmesine ve yoğun nüklear translokasyonuna yol açar (González-Moles ve ark. 2014).

Beta-katenin hücresel seviyesi çoğunlukla proteozomal degradasyon ile kontrol edilir. Wnt sinyal yolağı inaktifken; β -katenin yapısında bulunan serin bakımından zengin bölgelerden (N-terminal) yıkım kompleksi (Axin-APC-Ck1-GSK3) bileşenlerinden GSK-3 tarafından fosforillenir. Fosforilasyon β -katenin yıkımını uyarır. β -katenin fosforillenemez ve β -katenin'in sitoplazmadaki düzeyi ve nükleusa translokasyonu artar. CTNNB-1 geninde kanser gelişimine yol açan mutasyonlar genellikle β -kateninin fosforillenmesini engellediği gösterilmiştir (Gamallo ve ark. 1999).

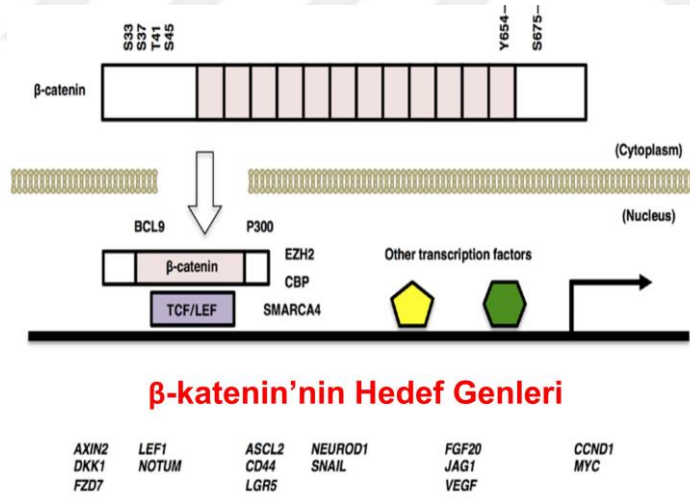
2.4.2. Wnt/ β -katenin (Kanonik Wnt Sinyal Yolağı)

Kanonik Wnt sinyal yolağı salgılanan Wnt ligandlarının (örneğin Wnt3a ve Wnt1) Fzd reseptörlerine ve LRP ko-reseptörlerine (Wnt sinyal aktif, sağ) bağlanması üzerine aktive edilir. LRP reseptörleri daha sonra, Dvl (Disheveled) proteinlerini polimerize ettikleri ve aktive ettikleri plazma zarına alan CK1a ve GSK3 β tarafından fosforile edilir. Dvl polimerleri, örneğin multiveziküler gövdelerde sekestrasyon yoluyla imha kompleksini inaktive eder. Bu inaktivasyon β -katenin'in stabilizasyonu ve birikmesi ile sonuçlanır. Nükleusa geçen β -katenin, TLE/Groucho kompleksleri ile yer değiştirerek LEF (lenfoid arttırıcı faktör) ve TCF (T hücre faktörü) proteinleri ile aktif bir kompleks oluşturur ve bu komplekse CBP/p300, BRG1, BCL9 ve Pygo gibi histon değiştiren koaktivatörler bağlanır. Oluşan çoklu transkripsiyonel anahtar, farklı hücresel süreçlerden sorumlu genlerin aktivasyonunu başlatır (Şekil (Ota ve ark. 2016; Zhan ve ark. 2017)).



Şekil 2-8: Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı.

β -kateninin nüklear lokalizasyonu çok sayıda hedef genin ekspresyonunu başlatır (Şekil 2.9) (Katoh ve Katoh 2017). Bu genlerin ekspresyonu sonucunda Wnt sinyal yolağı regülasyonu, hücre kaderinin belirlenmesi ve hücre çoğalması uyarılır.



Şekil 2-9: β -katenin'in Hedef Genleri.

2.4.3. Wnt Sinyal Yolağı ve Kanser İlişkisi

Birçok kanserde Wnt sinyalinin hiperaktivasyonu görülmektedir. Wnt sinyali hiperaktif olduğunda β -katenin nükleusta birikir ve hedef genlerin aşırı uyarımına neden olur (Bankfalvi ve ark. 2002). β -katenin'in aşırı aktivitesi OSHK'nın ilerlemesine katkıda bulunur; OSHK'da β -katenin hedef genlerinden siklin D1, survivin ve c-myc

yüksek oranda görülür (Reyese ve ark. 2020). Birçok kanserde β -kateninin anormal ekspresyonları gözlenmiş ve β -kateninin kanserlerde potansiyel prognostik belirteç olabileceği düşünülmüştür (Jawhari ve ark. 1997; Aaltomaa ve ark. 1999). Normal epitel dokularında β -katenin yoğun olarak hücre membranında bulunur, sitoplazmadaki β -katenin ise hızlı bir şekilde yıkıma uğrar. Kanser gelişiminin başlangıcında β -katenin hücre membranında azalır veya bazen hiç görülmez. Bu durum oral kanserler, özofagus kanserleri, kolon kanserleri gibi kanserlerde sıklıkla görülür (Bailey ve ark. 1998; 102. González-Moles ve ark. 2014).

Wnt sinyal yolağının karsinogenezdeki rolü en belirgin olarak kolorektal kanser için tanımlanmıştır, ancak lösemi, melanom, meme ve gastrointestinal kanserler gibi birçok kanser türünde de anormal Wnt sinyali gözlenmektedir (Zhan ve ark. 2017). Cancer Genome Atlas (TCGA) konsorsiyumu tarafından hazırlanan 2012 raporunda sporadik kolorektal kanserlerin %90'ından fazlasının Wnt sinyal yolağı regülatörlerinden en az birinde değişiklik içerdiği belirtilmiştir.

Hücrede β -katenin yıkımını engelleyen mutasyonlar (β -katenin geninin kendisinde veya yıkım kompleksi bileşeni APC genlerinde) rejeneratif sinyalleri değiştirmekte ve çeşitli malignitelerin gelişmesinde rol oynamaktadır (Giancotti 2014).

Wnt sinyali, meme kanseri hastalarının % 50'sinden fazlasında aktive edilmekte ve aktifleşmiş Wnt sinyalleri ve nükleusta yüksek oranda β -katenin birikimi sağ kalımı azaltmaktadır. Kanonik Wnt ligandları ve reseptörleri göğüs kanserlerinde sıklıkla aşırı eksprese edilmektedir (Zhan ve ark. 2017).

2.4.4. Wnt Sinyal Yolağı ve OSHK

Wnt yolunun düzensizliği oral karsinogenez ile yakından ilişkilidir. β -katenin oral displazinin OSHK'a malignant dönüşümde rol oynamaktadır (González-Moles ve ark. 2014). Aynı zamanda oral karsinoma hücrelerinde β -katenin ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Mohamed ve ark. 2007; Zhong ve ark. 2007; Reyese ve ark. 2020).

β -kateninin ağız kanseri dokularında genellikle yüksek oranda eksprese edildiği ve nükleusta yoğun β -katenin birikiminin proliferasyon, invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mohamed ve ark. 2007; Zhong ve ark. 2007). OSHK'da genellikle β -kateninin hücre membranındaki ekspresyonunda azalma görülür ve bu durum hücre hareketini ve çoğalmasını artırır; β -kateninin membrandaki azalması

tümör evresi, histolojik farklılaşma ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (Cai ve ark. 2008; Chaw ve ark. 2012; Zaid ve ark. 2014).

2.5. Survivin

Survivin, apoptoz inhibitörü (IAP) ailesinin bir üyesi bir proteindir. Survivin proteini, kaspaz aktivasyonunu (kaspaz 3 ve 9) inhibe eder, böylece apoptozun engellenmesi sağlanır.

Survivin ekspresyonu hücre döngüsü sırasında düzenlenir ve survivin sadece G2-M fazında eksprese edilir. Survivin mitoz sırasında tubulin ile etkileşime girer, mitotik iğ üzerinde yerleşir ve mitozun düzenlenmesine katkı sağlar (Sah ve ark. 2006). Survivin hayatta kalmayı nasıl regüle ettiğinin moleküler mekanizmaları iyi anlaşılmamıştır, ancak p53 proteini ile bağlantılı olduğu ortaya konmuştur. Survivin aynı zamanda Wnt sinyal yolağının doğrudan hedef genidir ve beta-katenin tarafından yukarı yönde (upstream) regüle edilmektedir (Olie ve ark. 2006).

Tüm IAP ailesi proteinleri için ortak olan yapısal özellik, hepsinin proteinin N-terminal yarısında korunmuş çinko-parmak Cys/His motifi ile karakterize edilen en az bir baküloviral IAP tekrar (BIR) alanı içermesidir. Survivin, diğer IAP ailesi üyelerinden yalnızca tek BIR alanına sahip olmasıyla ayrılır. İnsan survivin'i ayrıca 42 amino asit içeren uzun bir C-terminal sarmalı içerir. Survivin 16.5 kDa büyüklüğündedir ve IAP ailesinin en küçük üyesidir. Survivin BIR5 geni tarafından kodlanır (Verdecia ve ark. 2000).

Survivin onkogen olarak kabul edilmektedir çünkü çoğu kanser hücresinde anormal aşırı ekspresyonu, hücrelerin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve apoptotik uyarılara ve kemoterapötik tedavilere karşı dirence katkıda bulunur. Survivin, solid ve hematolojik malignitelerde yüksek oranda eksprese edilen, normal sağlıklı dokularda saptanamayan bir apoptoz inhibitörü proteindir. Akciğer, böbrek, cilt, endometriyum, mide, kolon, meme, prostat, yumurtalık, lösemi, baş ve boyun kanseri gibi çeşitli kanserlerde survivin aşırı ifadesi gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015).

2.6. CIP2A (Kanser İnhibitörü PP2A'nın İnhibitörü)

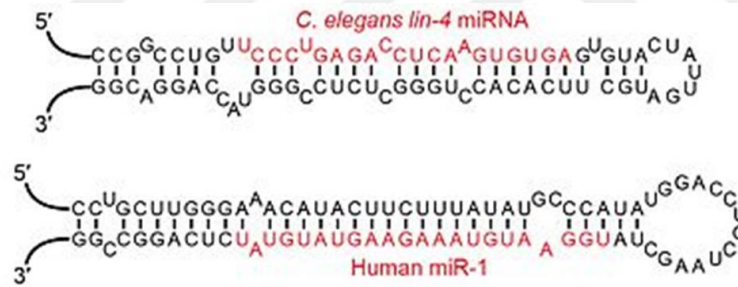
CIP2A kanser inhibitörü protein Protein fosfataz 2A (PP2A)'nın inhibitörüdür. PP2A hücre döngüsünün düzenlenmesinde çok yönlü kritik bir rol oynar. Neredeyse tüm ana yolları ve hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen, hücre döngüsüne

oranda eksprese edilir. CIP2A Kronik Miyeloid Lösemi (KML)'de imatinib'e (Gleevec) karşı dirençte rol oynar.

Meme kanserinde kanser hastalarının yaklaşık %40'ı CIP2A'yı aşırı eksprese ederken, incelenen diğer tüm kanser türlerinde sıklık % 65-87 arasındadır. Göğüs kanserinde CIP2A ekspresyonu hastalığın agresifliği ile bağlantılıyken, mide ve akciğer kanserinde CIP2A ekspresyonu düşük sağkalım ile ilişkili bulunmuştur. Yüksek CIP2A ekspresyonu çoğu kanserde kötü prognozun belirteçidir.

2.7. MikroRNA'lar (miRNA)

miRNA'lar 18-24 nükleotid uzunluğunda, kodlayıcı olmayan RNA molekülleridir ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası ana epigenetik regülatörlerindendir. miRNA'lar ilk kez *Caenorhabditis elegans*'ta keşfedilmiştir (lin-4 ve let-7) ve gelişimle ilişkili oldukları öne sürülmüştür (Reinhart BJ. ve ark. 2000). İnsanda ise ilk belirlenen miRNA hsa-miR-1'dir (Şekil 2.11).

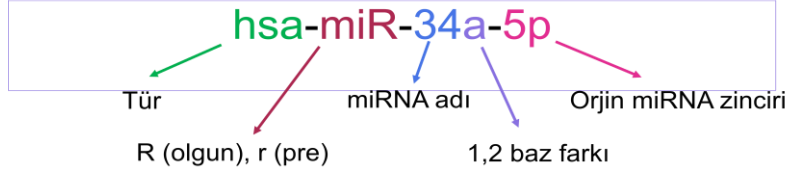


Şekil 2-11: miRNA Yapısı

Mirbase veri tabanında (www.mirbase.org) günümüzde tanımlanmış 1917 prekürsör, 2655 olgun miRNA kaydı bulunmaktadır. miRNA'lar hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesine bağlanarak translasyonun durmasına ya da mRNA'nın yıkımına neden olmaktadır. Bir miRNA çok sayıda mRNA üzerinde etki gösterebilmektedir.

miRNA genlerinin büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronik bölgelerinde bulunur, ancak genler arası bölgelerde ya da ekzonlarda da bulunabildikleri gösterilmiştir (Kehl ve ark. 2017). Bir miRNA ait olduğu türe göre isimlendirilir (Şekil 2.12). Örneğin insan miRNA'ları hsa (*Homo sapiens*) kodu ile başlar. Tür isminden sonra sıra ile miR kısaltması ve o miRNA'ya ait numara (keşfedilme sırasına göre belirlenmiş) yazılır. Eğer aynı miRNA'nın 1-2 baz farklı bir versiyonu ise numaranın

yanına bir harf kodu yazılır. Bazı durumlarda bir öncül miRNA'dan birden çok miRNA oluşabileceği için bu durumun ayrımı * (yıldız) işareti ile yapılır. Son olarak miRNA'nın 3' ya 5' zincirden sentezlenmesine göre 3p ya da 5p ile isimlendirme tamamlanır.



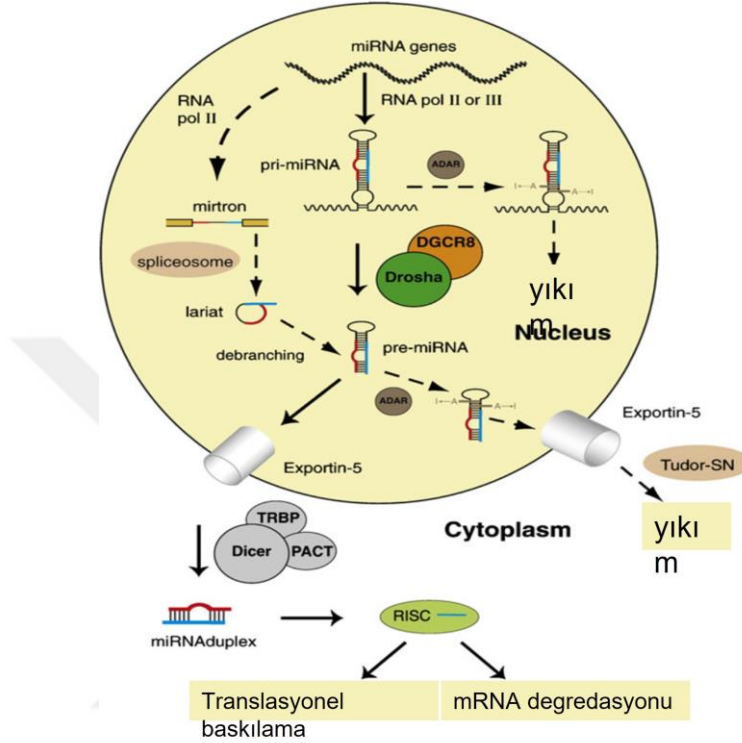
Şekil 2-12: miRNA İsimlendirilmesi

Bir miRNA'nın bir mRNA üzerindeki baskılama etkisinin gücü birden fazla faktör ile belirlenir. Bu faktörler; mRNA'yı hedef alan 5' çekirdek (seed) 3' regülatör, evrimsel korunmuşluk, mRNA 5'UTR, ORF ve kodlama dizisi (CDS) ve miRN8mer, 7mer, 7mer-A1, 6mer bölgeleridir. miRNA'ların 5' ucundaki 2-7. nükleotitler hedef mRNA'ya ne kadar spesifik şekilde bağlanacağını belirler (Kehl ve ark. 2017). miRNA ve çeşitli proteinlerden meydana gelen miRISC kompleksi hedef mRNA'ların ORF "Open Reading Frame" bölgesine bağlanır. Hedef mRNA'nın tespiti miRNA'ların 5' ucundaki 2-7 nükleotid uzunluğunda çekirdek dizi (seed) tarafından gerçekleşir Aynı aileye ait miRNA'larda çekirdek dizi aynıdır ve benzer fonksiyonlar gösterirler (Vidigal ve Ventura, 2015).

2.7.1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar ilk olarak öncül transkriptler halindedir ve kesilme aşamalarından geçerek etkin miRNA formunu alırlar (Şekil 2.13). miRNA'lar 60-70 bç'lik hairpin (saç tokası) transkriptler halinde RNA polimeraz II tarafından sentezlenirler. Bu ilk miRNA yapısı pri-miRNA olarak adlandırılır. pri-miRNA Drosha-DGR8 protein kompleksi tarafından; 5' ve 3' uçlarından kesilir ve pre-miRNA oluşur. Drosha bir RNaz III'tür (RNaz IIIa ve IIIb bölgelerini içerir). DGR8 ile Drosha'nın miRNA'ya bağlanmasını sağlar. Oluşan Pre-miRNA exportin-5 (GTP-bağlayıcı protein) ile nükleustan sitoplazmaya geçer. Bu geçiş RNA-GTP bağlantısını ve bir GTP'nin GDP'ye dönüşmesini kapsar. Sitoplazmada pre-miRNA Dicer-TRBP kompleksi ile etkileşir. Dicer RNA'ya bağlanan helikaz bölgesi, kesimi gerçekleştiren RNaz III bölgesi ve PAZ (miRNA'nın uçlarına bağlanan bölge) içerir. Dicer'in TRBP ile

birleşerek oluşturduğu kompleks oluşturulacak miRNA'nın uzunluğunun belirlenmesini sağlar. Dicer kesimi ile olgun (mature) miRNA oluşur. Olgun miRNA RISC (RNA aracılı susturma) kompleksi ile AGO (argonat) proteinine bağlanır; hedef mRNA'nın yıkımına yol açar veya translasyonu durdurur. (Huang ve ark. 2011).



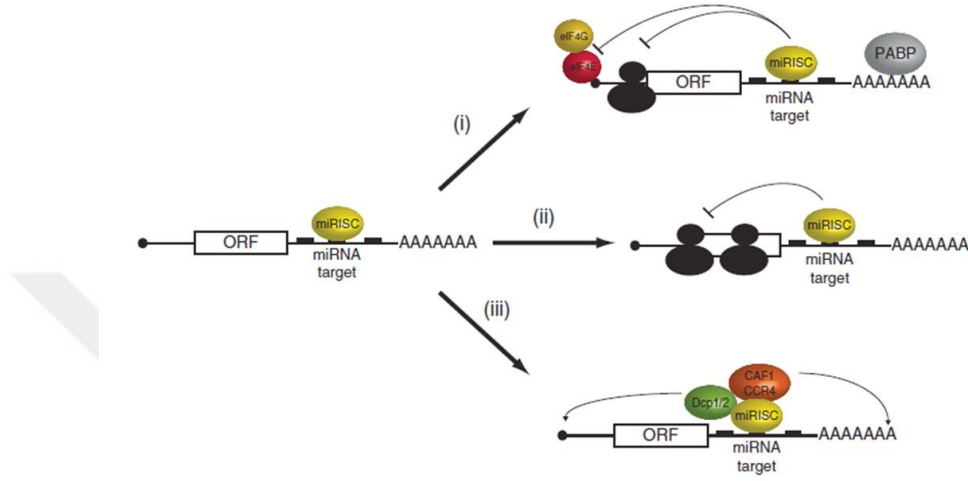
Şekil 2-13: miRNA Biyogenezi

miRNA'nın bağlandığı AGO proteinleri miRNA'nın 3'ucuna (PAZ bölgesi aracılığı ile) bağlanır. miRNA'nın çekirdek bölgesi de hedef mRNA'daki komplementer dizisi ile eşleşir. Eşleşme sonrasında mRNA baskılanır. AGO2 proteini baskılanan mRNA'nın degradasyonunu gerçekleştirir. Ancak insanlarda üç farklı tipte AGO proteini daha vardır. AGO2 dışındaki AGO proteinleri doğrudan yıkım yapmaz, translasyonel baskılama veya deadenilasyon yaparlar ya da miRNA'yı yıkıma doğru yönlendirirler (Vidigal ve Ventura 2015).

2.7.2. miRNA Aracılı mRNA Baskılanması

miRNA'lar hedef mRNA'larını üç farklı mekanizma ile baskırlarlar. Birinci mekanizma translasyonun başında engelleme mekanizmasıdır. miRNA hedef mRNA'nın 5'cap (5'sapka) bölgesine bağlanır. bu durumda mRNA ribozoma bağlanamaz. Bir diğer durum translasyon sırasındaki baskılamadır. Protein sentezi durdurulur ve proteinin uzaması engellenir. Bu iki mekanizma mRNA'nın yıkım

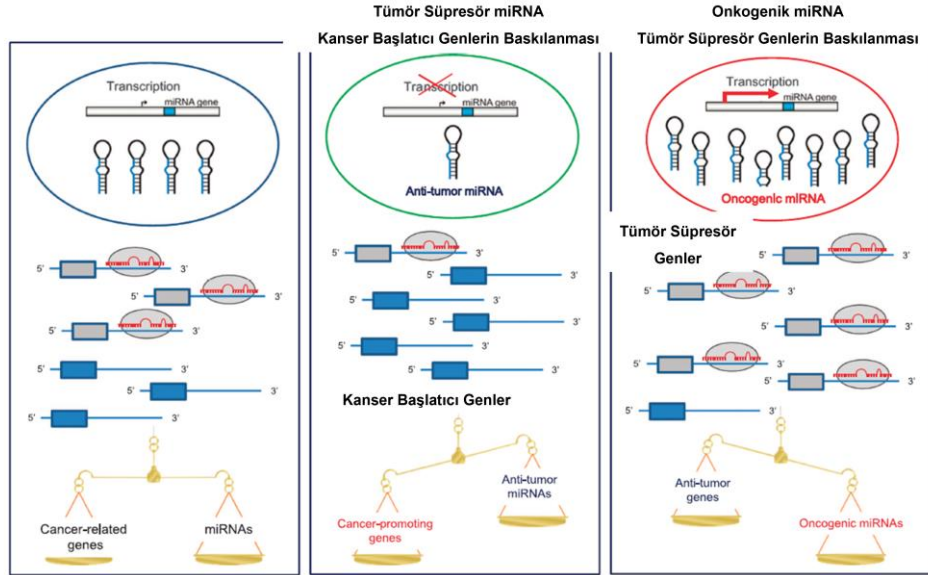
sürecine geçişinde rol oynar. mRNA'nın 5' ucunda adedenilasyon meydana gelir ve DCP2 deadenile olmuş 5' başlık yapısını keser. 5' başlık uzaklaştırılınca mRNA XRN1 (sitoplazmik ekzonükleaz) tarafından hedef alınarak degradasyona uğrar. Üçüncü mekanizma mRNA'nın doğrudan parçalanmasını içerir (Şekil 2.14) (Vidigal ve Ventura 2015).



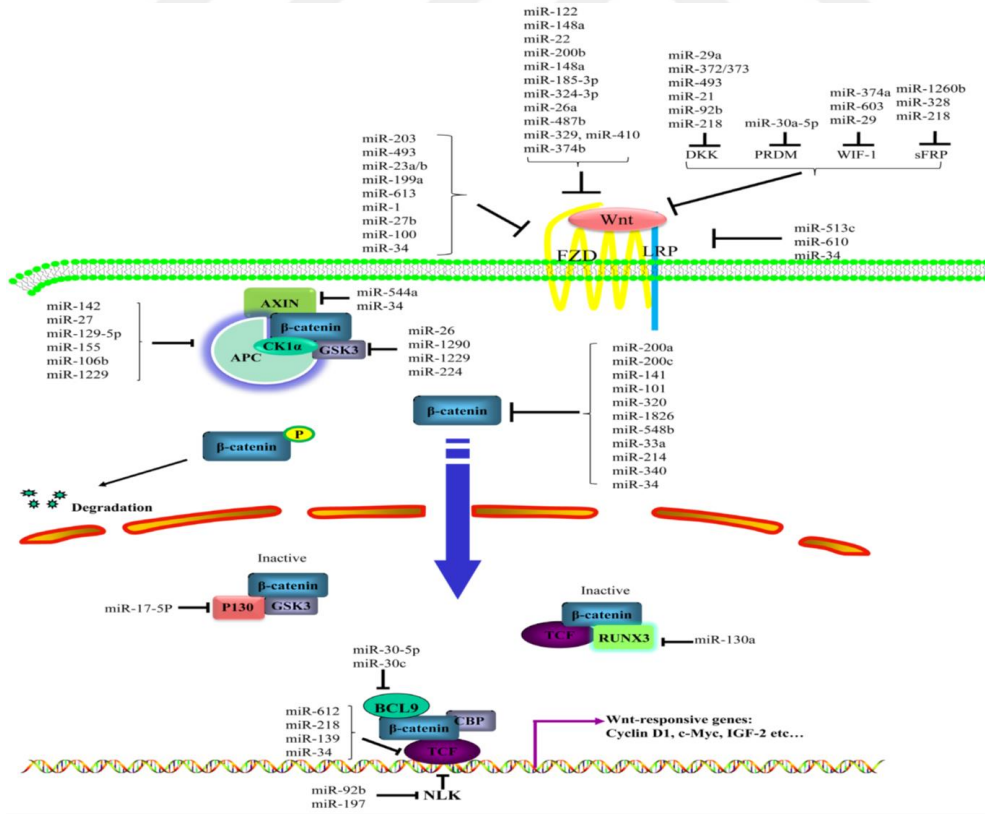
Şekil 2-14: miRNA Aracılı mRNA Baskılanması.

2.7.3. miRNA'ların Kansere Gelişimindeki Fonksiyonu

İnsanlarda protein kodlayan genlerin yaklaşık yarısının ekspresyonunun miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. miRNA'lar hücre çoğalması, apoptoz, hücre farklılaşması, hematopoez, otoimmünite ve tümörögenez gibi hücresel süreçlerde rol oynamaktadır (Cao ve ark. 2017). Tümör gelişimini destekleyen miRNA'lar onko-miR olarak sınıflandırılırken, tümör baskılayıcı özellikte olanlar tümör süpresör-miR olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.15) (Kinoshita ve ark. 2011). Normal şartlarda tümör süpresör ve onkogenik miRNA'lar dengededir. Tümör süpresör miRNA'lar kanser başlatıcı genlerin baskılanmasında, onkogenik miRNA'lar ise tümör baskılayıcı genlerin baskılanmasında rol oynar. Kansereleşme sürecinde tümör süpresör-miR'lerin ekspresyonlarında azalma, onkogenik miR'lerin ekspresyonunda ise artış görülür. Bu ekspresyon seviyelerindeki bu düzensizlikler çeşitli sinyal yolları (ör. Wnt) üzerinde etkili olur (Şekil 2.16) (Peng ve ark. 2017).



Şekil 2-15: Tümör-Süpresör ve Onkogenik miRNA'lar.



Şekil 2-16: Wnt Sinyal Yoluğu Üzerinde Etkili miRNA'lar.

miRNA'ların mide kanseri, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, glioblastoma, prostat kanseri ve kolorektal kanser, baş ve boyun kanserleri ve OSHK gibi insan neoplazmalarında sıklıkla anormal şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir. miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler sağlıklı hücrelerde bulunan normal sinyal ağlarını bozarak onkogenik gelişime neden olmaktadır.

2.7.4. OSHK ve miRNA'lar

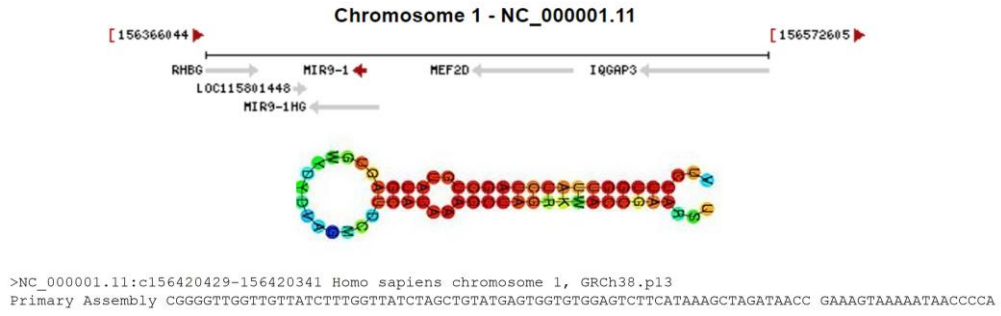
miRNA'lar kan, tükürük, idrar gibi vücut sıvılarında oldukça fazla miktarda bulunmaktadır ve patolojik değişkenlerle yakından ilişkilidir. Birçok kanser türünde vücut sıvılarında serbest dolaşan miRNA'ların sağlıklı kontrollere göre seviye farklılıkları gösterdiği belirtilmiştir. Serbest dolaşan miRNA'lar yüksek stabiliteye sahiptir ve kanserde biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir (Cao ve ark. 2017).

OSHK'da ekspresyon farklılığı saptanmış çok sayıda miRNA bulunmaktadır. miR-155, miR-21, miR-31, miR-17, miR-15a, miR-223, miR-221 OSHK'da ekspresyonu artış gösteren, miR-126, miR-139, miR-34a, miR-203, miR-375, miR-137, miR-145 OSHK'da azalan miRNA'lara örnektir (Mazumder ve ark. 2019). Güncel çalışmalarda miRNA'lar OSHK tanısı, prognozunun takibi, hastanın sağ kalımının ve tedavi tepkisinin tanımlanması gibi birçok farklı alanda biyobelirteç olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. miRNA'lar aynı zamanda çok sayıda hedef geni kontrol ederek önemli hücresel süreçleri düzenlemekte rol oynadığı için, OSHK miRNA'lara dayalı anti-kanser tedavileri de gündemdedir.

2.7.4.1. miR-9

miR-9 (miR-79'a homolog), MIR9-1 geninden (1q22) kodlanır ve baskın olgun miRNA dizisi, miR-9 öncüsünün 5' kolundan ve miR-79 öncüsünün 3' kolundan işlenir (Şekil 2.17). İnsan genomunda, üç bağımsız miR-9 öncüsü (miR-9-1, miR-9 2 ve miR-9-3) mevcuttur ve aynı olgun miR-9'u kodlar. Omurgalılarda, miR-9 beyinde yüksek oranda eksprese edilir ve nöronal farklılaşmanın düzenlenmesinde rol oynar. Hedef genleri arasında transkripsiyon faktörleri REST ve CoREST yer alır.

miR-9'un çeşitli kanserlerin başlangıcındaki ve progresyonundaki rolü üzerine çalışmalar bulunmaktadır. miR-9 çoğalma, hücre hareketi, apoptoz ve metastaz ile ilişkili çok sayıda geni hedef alır. Birçok kanserde miR-9'un anormal ekspresyonu gözlenmiştir ve karsinogenezde belirgin fonksiyonu vardır (Kahafei ve ark. 2019).



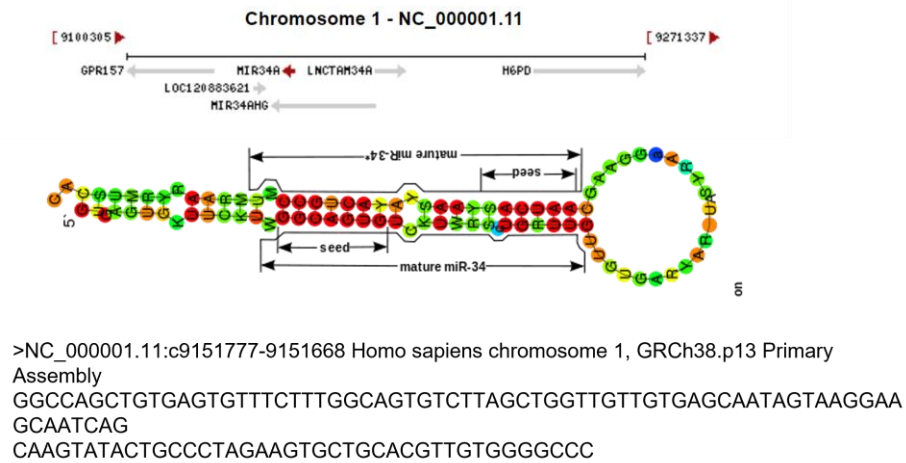
Şekil 2-17: miR-9 Geninin Kromozomal Lokasyonu ve Baz Dizisi

miR-9 bazı kanserlerde tümör süpresör etkiye sahipken; bazı kanserlerde onkogeniktir. Tümör süpresör miR-9 hücre çoğalması, anjiyogenez ve migrasyon ile ilişkili genleri baskılar. Kolon kanseri, nazofarengal karsinoma, melanoma ve meme kanserlerinde miR-9 ekspresyonlarının azaldığı görülmüştür (Li ve ark. 2009; Gao ve ark. 2013; Liu ve ark. 2012). Oral ve orofarengal SHK'larda miR-9 benzer etki gösterir. Bu kanserlerde miR-9 geninin metilasyonunun arttığı saptanmıştır ve miR-9'un tümör gelişimi ve metastazını baskıladığı rapor edilmiştir (Minor ve ark. 2012).

Hepatosellüler karsinomada ve osteokarsinomada ise miR-9 onkogenik bulunmuştur. mir-9 ekspresyon artışı hücre çoğalması ve tümör metastazı ile ilişkilendirilmiştir (Farazi ve ark. 2011).

2.7.4.2. miR-34-a

miR-34a MIRN34A geninden (1p13) kodlanır (Şekil 2.17).



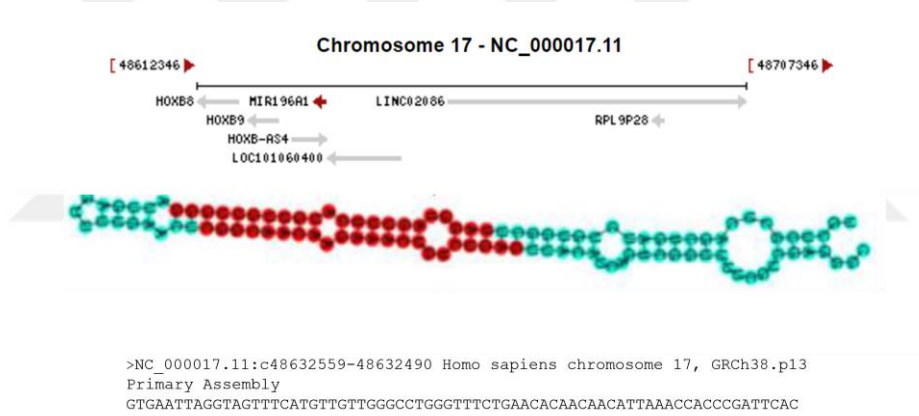
Şekil 2-18: miR-34a Geninin Kromozomal Lokasyonu ve Baz Dizisi

miR-34a kanser gelişiminde çok çalışılmış bir miRNA'dır ve hedefleri arasında Wnt ve PI3K sinyal yollarının çok sayıda bileşeni vardır (Hermeking 2010). WNT1, CTNNB1, AXIN2, PIK3CA, PTEN, MAP2K, AKT, CDKN1A miR-34a'nın baskıladığı genlerdendir. miR-34 ekspresyon artışı kanser hücrelerinin çoğalması, sağkalımı ve ilaç direnci gibi süreçlerde rol oynar. miR-34a etkili bir tümör süpresördür. Lösemi, lenfoma, over kanseri ve gliomalarda azalmış miR-34a ekspresyonu rapor edilmiştir (Slabáková ve ark. 2017). miR-34a aynı zamanda apoptozda da görev alan bir miRNA'dır (Raver-Shapriha ve ark. 2007; Hermeking 2010).

Baş-boyun skuamöz hücreleri karsinomlarında miR-34a'nın tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kumar ve ark. 2012).

2.7.4.3. miR-196a

miR-196a MIR196A1 geninden (17q21.32) kodlanır (Şekil 2.19).



Şekil 2-19: mir-196a Geninin Kromozomal Lokasyonu ve Baz Dizisi

miR-196a onkogenik bir miRNA olarak nitelendirilmiştir ve FOXO1, p27, IκBa, netrin4, mTOR ve PI3K gibi birçok gen üzerinde etkisi vardır. miR-9'un artan ekspresyonu hücre çoğalmasını artırır (Song ve ark. 2020). miR-196a küçük hücreli dışı akciğer kanseri, mide kanseri ve meme kanseri gibi kanserlerde hücre çoğalması ve invazyonu artırır (Liu ve ark. 2012; Tsai ve ark. 2014; Zhang ve ark. 2014). miR-196a'nın OSHK hücrelerinde FOXO1'i hedef alarak hücre çoğalması, apoptoz ve metastaz üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Song ve ark. 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Grupları

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda (AD) ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları AD'nda takipli, Amerikan Kanser Ortak Komitesinin Tanımladığı (American Joint Committee on Cancer Staging, 2002) TNM evreleme sistemine göre OSHK tanısı almış 31-67 yaş aralığında, 24 hasta dahil edilmiştir.

OSHK gelişme riski yüksek FA hasta gurubuna İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD'nda, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Onkoloji AD'ında ve Altınbaş Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Onkoloji AD'ında tanı almış, 14-32 yaş aralığında 24 hasta dahil edilmiştir.

Çalışmaya OSHK gelişme riski bulunan diğer grup için sigara içen sağlıklı, 25-64 yaş aralığında sağlıklı 20 gönüllü kontrol ve sigara içemeyen sağlıklı, 25-53 yaş aralığında 20 gönüllü kontrol dahil edilmiştir. Sigara içen kontrollere Fagerstörn nikotin bağımlılık testi uygulanmış ve test sonucu 7 ve üzeri çıkanlar (yüksek bağımlılık) çalışmaya alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilecek grup sayıları daha önce yapılan çalışmalara bakılarak istatistiksel olarak anlam sağlayacak şekilde belirlenmiştir. Çalışma için İstanbul Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 13.11.2019 tarih ve 1307 sayılı karar ile izin alınmıştır.

Çalışma için hasta ve gönüllü gruplarından 01.01.2020-01.09.2020 tarihleri arasında biyolojik örnek (kan ve tükürük) toplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm hasta ve kontrol gruplarına çalışma hakkında bilgi verilmiş ve bilgelendirilmiş gönüllü olur formu imzalatılarak çalışmaya alınmışlardır.

Tüm hasta ve gönüllülerin demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara-alkol tüketimi, ağız hijyeni, ağız yarası, aile kanser öyküsü) bilgi formuna kaydedilmiştir. OSHK hastalarının klinik ve patolojik bulguları (T evresi, LNM, tümör boyutu, tümör diferansiyasyonu, invazyon, prograsyon, kemoterapi ve radyoterapi yanıtları) hasta bilgi formuna not edilmiştir.

3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Çalışma için OSHK hastalarından, FA hastalarından, sigara içen ve sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubundan 5 ml tükürük (RNAz ve DNaz içermeyen, steril boş tüpe) ve 1 tüp kan örneği alınmıştır. Örnekler sabah 09.00-10.00 saat aralığında alınmış, hasta gönüllülerin en az bir saat öncesinde yiyecek ve içecek tüketmemiş olmalarına dikkat edilmiştir. Tükürük örnekleri buz içerisinde toplanmıştır.

Buz içinde toplanan tükürük örnekleri bekletilmeden alikotlanarak, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'da -80 °C'ye kaldırılmıştır. Kan tüplerinin 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmesiyle sonra elde edilen serum örnekleri de alikotlanarak İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'da -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.3. Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeleri

DNA/RNA Shield (Zymo RESEARCH, Kat. No: R1100-250)

Quick-RNA Miniprep (Zymo RESEARCH, Kat. No: R1054)

Proteinase K (Invitrogen Kat. No: AM2542)

Etanol %99 (Merck)

RNAz, DNaz içermeyen su (Thermo Fisher Scientific, Kat. No: R0581)

miRCURY LNA miRNA PCR Assay (QIAGEN, Kat No: 339306)

miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, Kat No: 339346)

miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, Kat No: 339340)

Human Survivin Elisa Kit (BT-Lab, Kat No: E3904Hu)

Human Survivin Elisa Kit (BT-Lab, Kat No: E3904Hu)

Human Cancerous Inhibitor of PP2A (CIP2A) Elisa Kit (BT-Lab, Kat No: E6667Hu)

Human β catenin, β -Cat Elisa Kit (BT-Lab, Kat No: E1651Hu)

50 ml DNase/RNase içermeyen falkon tüp (Axygen, Kat No: SCT-50ML-25-S)

15 ml DNase/RNase içermeyen falkon tüp (Axygen, Kat No: SCT-15ML-25-S)

1,5 ml DNase/RNase içermeyen eppendorf tüp (Axygen, Kat No: MCT150C)

2 ml DNase/RNase içermeyen eppendorf tüp (Axygen, Kat No: MCT200C)

0-10 µl steril, filtreli pipet ucu (Corning, Kat No: 4901)

2-20 µl steril, filtreli pipet ucu (Axygen, Kat No: TTF-20-C-HTR-S)

10-200 µl steril, filtreli pipet ucu (Corning, Kat No: 4803)

100-1000 µl steril, filtreli pipet ucu (Corning, Kat No: 4713)

PCR Tüpleri, 0,2 ml (QIAGEN, Kat No: 981005)

3.4. Cihazlar

Derin dondurucu (-80°C) (Thermo HFU B)

Budolabı (Vestel)

Vorteks (Multispin MSC)

Santrifüj (Hermle)

Santrifüj (Hettich)

PCR cihazı (Benchmark)

Real Time PCR cihazı (QIAGEN Rotorgene)

Spektrofotometre (NanoDrop 2000)

ELISA Plate Reader (Biotek)

Mikropipet (Eppendorf)

3.5. Yöntem

3.5.1. Biyoinformatik Analizler ve Literatür Taraması

Tez çalışması için OSHK gelişimde öne çıkan PI3K ve Wnt sinyal yolları ile ilişkili miRNA'lar literatür taramasının yanında, DIANA Tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) ve miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) veritabanları kullanılarak belirlendi. Belirlenen miRNA'lar arasından tükürükte eksprese olduğu bilinen 3 adet miRNA (miR-34a, miR-9 ve miR-196a) seçildi. Yine literatür taraması yapılarak survivin, CIP2A ve β -katenin proteinlerine karar verildi.

3.5.2. Tükürük Örneklerinden miRNA İzolasyonu

Tükürük örneklerinden miRNA izolasyonu Quick-RNA Miniprep (Zymo RESEARCH) kiti kullanılarak yapıldı. Kit içinden çıkan RNA Wash Buffer üzerine 96 ml %99 etanol (EtOH) eklenerek hazırlandı. DNase I ise üzerine 275 ml DNaz/RNaz içermeyen su eklenerek hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'ye kaldırıldı. Proteinaz K (Invitrogen) 20mg/ml stok solüsyon olacak şekilde; 5 ml DNaz/RNaz içermeyen su eklenerek hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'ye kaldırıldı. RNA izolasyonundan önce tüm ortam ve kullanılacak pipetler RNase/DNase Away (Trisience) solüsyonu ile temizlendi.

-80 °C'den çıkarılan tükürük örnekleri buz içine alındı ve erimeleri beklendi. Örnekler erir erimez 400 µl tükürük örneği temiz bir tüpe alındı ve üzerine 1:1 oranında DNA/RNA Shield solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Karışım üzerine 25 µl (20 ng/l) Proteinaz K eklendi ve karıştırıldıktan sonra oda ısısında 15 dakika (dk.) bekletildi. Proteinaz K ile muamele edilen örnek tüplerine 600 µl RNA lysis buffer eklendi. Lizise uğrayan karışım sarı renkli Spin Away Filter kolona yüklendi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolon atıldı ve süpernetant yeni bir tüpe alındı. Üzerine 1:1 oranında %99 EtOH eklendi ve vorteklendi. EtOH-süpernetant karışımı yeşil renkli Zymo-Spin™ IIICG Column kolonuna yüklendi. 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernetant atıldı ve kolon 400 ml RNA Wash Buffer ile yıkandı. Süpernetant atıldı. Daha sonra kolon üzerine 5 µl DNase I ve 75 µl DNA Digestion Buffer solüsyonu eklendi ve 15 dk oda ısısında bekletildi. İnkübasyon bitince kolona 400 µl RNA Prep Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernetant atıldı. Kolon üzerine 700 µl RNA Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernetant atıldı. Kolon üzerine 400 µl RNA Wash Buffer eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Kolon temiz bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 50 µl DNase/RNase içermeyen su eklendi. 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. İzole edilen RNA örnekleri saflık ve konsantrasyonları ölçüldükten k -80 °C'ye kaldırıldı.

3.5.3. İzole Edilen RNA'ların Saflık ve Konsatrasyonlarının Ölçülmesi

İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon oranları nanodrop spektrofotometre ölçüldü ve A260/A280 oranının 2,0 civarında olan örnekler saf olarak kabul edildi. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonlarının ise 20 ng/µl'den yüksek olmasına dikkat edildi.

3.5.4. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Çalışmamızda miRNA analizleri miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR Sistemi ile gerçekleştirildi. Bu sistem SYBR Green boyası kullanılarak katitatif PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile; miRNA'nın hassas ve doğru tespiti için tasarlanmış miRNA'ya özgü, LNA tabanlı bir sistemdir. Yöntem, evrensel ters transkripsiyon (RT) ile cDNA sentezine, ardından LNA (Locked nucleic acids) ile geliştirilmiş primerler (miRCURY LNA miRNA PCR Assay) ile katitatif PCR amplifikasyonuna dayanmaktadır. LNA yüksek afiniteli bir RNA analogudur ve termal stabilitesi yüksektir.

cDNA sentez reaksiyonunun birinci amacı izole edilen miRNA'nın 3' ucuna bir çoklu adenin zinciri (3' poly A tail) eklemektir. Daha sonra poly A kuyruğuna bağlanan bir çoklu T pirimer zinciri sayesinde; ters transkriptaz (reverse transcriptase) enzimi tarafından RNA komplementeri olan cDNA'ya dönüştürülür. cDNA reaksiyonu için miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit kullanıldı.

cDNA sentezi için öncelikle optimum RNA konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng ve 250 ng konsantrasyonlarda RNA içerecek şekilde deneme PCR'ı hazırlandı. Bunun için PCR reaksiyonuna eklenecek RNA ve su miktarlarını belirten bir tablo oluşturuldu. Deneme örnekleri bir OSHK hastası ve bir sağlıklı kontrol olarak seçildi ve her örnek için 5 ayrı konsantrasyonda RNA denendi.

miRCURY LNA SYBR Green PCR bileşenleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3-1: SYBR Green PCR Reaksiyon Karışımı

miRNA miRCURY SYBR® Green PCR	
5x miRCURY SYBR® Green	2 µl
RT Reaction Buffer	
RNase-free water	4.5 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µl
RNA spike-in	1 µl
Template RNA	1 µl
Toplam Reaksiyon	10 µl

Çalışmanın yapılacağı alan ve mikropipetler RNase/DNase Away solüsyonu ile temizlendi. -80 °C'den çıkarılan RNA örnekleri buz üzerinde çözüldü. PCR tüplerine her örneğin 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng ve 250 ng'lık konsantrasyonları için hazırlanan tabloya göre uygun miktarlarda RNaz içermeyen su (kit protokülüne göre max. 4,5 µl) konuldu. Her örnek için 2 µl 5x miRCURY SYBR® Green RT Reaction Buffer, 0,5 µl UniSp6 RNA spike-in, 1 µl 10x miRCURY RT Enzyme Mix içerecek şekilde master mix karışımı hazırlandı. Solüsyonların buz içinde bekletilmesine dikkat edildi. Her PCR tüpüne 3,5 µl master mix dağıtıldı. Son olarak uygun konsantrasyonları oluşturacak miktarlarda RNA örneği PCR tüplerine eklendi. Toplam hacmi 10 µl olan cDNA reaksiyonu PCR cihazında (Thermal cycler) 42°C'de 60 dakika (cDNA sentezi), 95°C'de 5 dk (denatürasyon) ve son olarak da +4 °C'de 10 dk şeklinde gerçekleştirildi ve elde edilen cDNA'lar -20 °C'ye kaldırıldı.

3.5.5. miRNA'ların Kantitatif SYBR Green PCR Analizleri İçin Kullanılan Primerler

Çalışmamızda incelenen miRNA'lar için kullanılan primerlerin dizileri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3-2: miRNA Primer Dizileri

Primer Adı	Baz Dizisi
hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
hsa-miR-196a-5p	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG
U6 snRNA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

3.5.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qPCR)

Elde edilen cDNA'ların kantitatif PCR (qPCR)'ı için miRCURY LNA miRNA PCR Assay primerleri ve miRCURY LNA RT Kit kullanıldı.

Assay içinde gelen liyofilize haldeki primerler 225 µl RNaz/DNaz içermeyen su içinde çözdürüldü. 20 dk oda ısısında bekletildi ve alikotlanarak -20 °C'ye kaldırıldı.

cDNA örnekleri 1:30 oranında olacak şekilde RNaz/DNaz içermeyen su ile seyreltildi. Seyrelmiş cDNA dondur-çözdür olmayacak şekilde hemen kullanıldı. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR miRCURY LNA RT Kit kullanılarak uygulandı. Reaksiyon karışım oranları Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3-3: miRCURY LNA RT qPCR Karışımı

miRNA miRCURY SYBR® Green PCR	
5x miRCURY SYBR® Green	2 µl
RT Reaction Buffer	
RNase-free water	4.5 µl
10x miRCURY RT Enzyme Mix	1 µl
RNA spike-in	1 µl
Template RNA	1 µl
Toplam Reaksiyon	10 µl

Her bir örnek için 10 µl 2x miRCURY SYBR® Green Master Mix, 2 µl primer solüsyonu, 6 µl 1:30 seyreltilmiş cDNA ve 1 µl RNaz/DNaz içermeyen su içerecek şekilde, toplam 20 µl hacimde reaksiyon karışımları hazırlandı. Hazırlanan karışım Qiagen Rotorgene Real Time PCR cihazına yerleştirildi ve uygun protokole göre reaksiyon gerçekleştirildi. Kantitatif PCR protokolü Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3-4: Kantitatif Real Time PCR Koşulları

Kantitatif Real Time PCR Koşulları	Süre	Sıcaklık
PCR Başlangıç Aktivasyonu	2 dk	95 °C
2 Basamaklı Döngü		
Denatürasyon	10 s	95 °C
Primer Bağlanması/Uzama	60 s	56°C
Döngü Sayısı	40	
Erime Eğrisi Analizi		65-95 °C

Kantitatif PCR tamamlandıktan sonra tüm örneklerin Ct değerleri, amplikasyon eğrileri ve erime eğrileri kontrol edildi.

İlk reaksiyonlar normalizatör olarak kullanılan U6 snRNA ile gerçekleştirildi. cDNA analizinin başında 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng ve 250 ng'lık RNA konsantrasyonları ile hazırlanan deneme örneklerinin kantitatif PCR sonuçları değerlendirildi. Buna göre 150 ng RNA'nın en ideal RNA konsantrasyonu olduğuna karar verildi. İleriki tüm cDNA reaksiyonları 150 ng RNA örneği içerek şekilde (reaksiyona katılacak su oranı değiştirilerek) ayarlandı.

Elde edilen RNA örneklerinin hepsi cDNA'ya dönüştürüldükten sonra ilk olarak tüm hasta ve kontrol gruplarında normalizatör referans genin (U6 snRNA) qPCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Daha sonra sırası ile miR-9, miR-34a ve miR-196a için qPCR reaksiyonları tamamlandı.

3.5.7. Kantitatif PCR (qPCR) Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kantitatif PCR sonuçlarının değerlendirilmesi Livak yöntemine göre yapılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001). Kantitatif PCR deneylerinde kullanılan cDNA miktarlarındaki farklılıkları dengeleyerek verileri normalize etmek amacıyla referans genler kullanılır. Bu referans genler farklı zaman ve koşullara göre alınan örneklerde ekspresyonları değişmeyen, devamlı belli bir seviyede eksprese edilen housekeeping genler arasından seçilir. Genellikle GADPH, ACTB veya 16S rRNA gibi genler referans genler olarak kullanılır. Ancak bu genler seçilirken iyi bir literatür araştırması yapmak ve kullanılacak kaynak materyaline ve çalışılacak hastalık tipine göre uygun ve doğru referans geni seçmek önemlidir.

Çalışmamızda referans gen olarak U6 snRNA (small nüklear RNA) kullanıldı. U6 snRNA miRNA çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir referans gendir ve çalışmamızın hasta grubuna ve tükürük örneklerinde kullanılmaya uygun olduğu literatür taramaları ile netleştirilmiştir.

Bir qPCR analizinde tüpteki örneğin çoğalması (amplikasyonu) ile oluşan floresan ışımanın (ör. SYBR green boyasının verdiği ışıma) qPCR cihazı tarafından görüldüğü döngü sayısı Ct (cycle threshold) değerini ifade eder.

qPCR sonuçlarının Livak yöntemi ile normalize edilmesi ve standardize edilmiş ekspresyon seviyelerinin hesaplanması için öncelikle qPCR Ct değerleri ele alınır ve öncelikle ΔCt değeri hesaplanır:

$$\Delta Ct = Ct (\text{araştırılmak istenen genin Ct değeri}) - Ct (\text{referans genin Ct değeri})$$

Bu hesaplama tüm hasta ve kontrol grupları için yapılır ve her grubun ΔCt ortalaması hesaplanır. Daha sonra $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplanır:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{araştırılmak istenen genin } \Delta Ct \text{ değeri}) - \text{ort. kont. } \Delta Ct \text{ (kontrol grubunun } \Delta Ct \text{ ortalaması)}$$

Son olarak standartize edilmiş ekspresyon için rölatif bir sayısal değerin belirlenmesi amacı ile her örnek için şu hesaplama yapılır:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ (Tüm örneklerin } \Delta\Delta Ct \text{ değerleri)}$$

Elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri örnekler için standardize edilmiş ekspresyon seviyesini belirlemek veya kontrol gruplarına göre hasta gruplarında kaç kat ekspresyon değişimi olduğunu hesaplamak için kullanılabilir.

3.5.8. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Serum Protein Düzeylerinin Ölçülmesi

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testi bir antijen ve antikor arasındaki reaksiyonun gözlenmesine dayanan bir analizdir. Bu testte ölçülmek istenen proteine özgü antikorlar ile kaplı olan plate (kuyucuklu tabaka) kullanılır. Araştırılmak istenen örnek plate kuyucuğuna konulduğu zaman; örnekteki proteinler kuyucuklardaki antikorlara bağlanır. İkinci aşamada kuyucuklara biyotin ile işaretlenmiş ikinci antikorlar konur. Bu antikorlar örnekteki proteinlere bağlanır. Üçüncü aşamada kuyuya streptavidin-HRP solüsyonu eklenir. Streptavidin biyotinle işaretli antikorlara bağlanır. Bu aşamada bir süre plate bir süre inkübe edilir ve sonrasında bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için yıkama işlemleri yapılır. Son aşamada kuyucuklara substrat solüsyonu eklenir. Bu solüsyon renk değişimi oluşturan bir reaksiyon sağlar. Bu reaksiyon bir durdurma solüsyonu eklenerek durdurulur. Kuyucuklarda farklı protein konsantrasyonlarına göre oluşan renk değişimleri uygun absorbans değerlerinde

spektrofotometrik okuma yapan ELISA plate reader cihazında okutulur ve her kuyucuk için optik densite (OD) değerleri belirlenir.

Çalışmada survivin ölçümleri için Human Survivin Elisa Kit (BT-Lab), CIP2A ölçümleri için Human Cancerous Inhibitor of PP2A (CIP2A) Elisa Kit (BT-Lab) ve Human β -katenin ölçümleri için Human β -catenin, β -Cat Elisa Kit (BT-Lab) kullanıldı. Tüm analizlerde aynı protokol uygulandı ve her plate 450 nm’de ölçüldü. Çalışmada kullanılan ELISA kitlerinin standart eğri aralıkları ve duyarlılıkları Tablo 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3-5: ELISA Kitlerinin Standart Eğri Aralıkları ve Duyarlılıkları

ELISA Kiti	Standart Eğri	Duyarlılık
Human Survivin Elisa Kit	5ng/ml - 1000ng/ml	2.49 ng/ml
Human Cancerous Inhibitor of PP2A (CIP2A) Elisa Kit	10ng/ml - 2000ng/ml	4.29ng/ml
Human β catenin, β -Cat Elisa Kit	0.2ng/ml -60ng/ml	0.102 ng/ml

Her bir protein ölçümü için ELISA testine başlanmadan önce kit içinden çıkan şemaya göre standart solüsyonlar hazırlanmıştır. Survivin ELISA ölçümleri için standart solüsyonların hazırlanışı Tablo 3.6’da, CIP2A ELISA ölçümleri için standart solüsyonların hazırlanışı Tablo 3.7’de ve β -katenin ölçümleri için standart solüsyonların hazırlanışı Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3-6: Survivin ELISA Ölçümleri İçin Standart Solüsyonların Hazırlanışı

640ng/ml	Standart No.5	120 μ l Orjinal Standart + 120 μ l Standard Diluent
320ng/ml	Standart No.4	120 μ l Standard No.5 + 120 μ l Standard Diluent
160ng/ml	Standart No.3	120 μ l Standard No.4 + 120 μ l Standard Diluent
80ng/ml	Standart No.2	120 μ l Standard No.3 + 120 μ l Standard Diluent
40ng/ml	Standart No.1	120 μ l Standard No.2 + 120 μ l Standard Diluent

Tablo 3-7: CIP2A ELISA Ölçümleri İçin Standart Solüsyonların Hazırlanışı

1200ng/L	Standard No.5	120µl Orijinal Standard + 120µl Standard Diluent
600ng/L	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
300ng/L	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
150ng/L	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
75ng/L	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

Tablo 3-8: β-katenin Ölçümleri İçin Standart Solüsyonların Hazırlanışı

40ng/ml	Standard No.5	120µl Orijinal Standard + 120µl Standard Diluent
20ng/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
10ng/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
5ng/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
2.5ng/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

ELISA testine başlamadan önce standart çözeltiler hazırlandı ve 25x Wash Buffer steril distile su ile 1x olacak şekilde seyreltilti.

Kullanmadan önce tüm solüsyonlar ve örnekler oda sıcaklığında bir süre bekletildi. Standart kuyucuklarına standart solüsyonlardan 50'şer µl eklendi. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmedi. Örnek kuyucuklarına 40µl serum eklendi ve ardından 10µl anti- (survivin veya CIP2A veya β-katenin) antikoru eklendi ve blank kontrol kuyucuğu haricindeki tüm kuyucukların üzerlerine 50µl streptavidin-HRP eklendi. İyice karıştırıldı. Plate film ile kapatıldı ve etüv içinde 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plate 5 kez 1x wash buffer (yıkama tamponu) ile yıkandı. Her yıkama için 1 dakika süreyle 400 ml yıkama tamponu kullanıldı. Plate her yıkama sonrasında filtre kağıdı üzerinde kurutuldu. Yıkamalar bitince kuyucuklara 50µl substrat solüsyonu A eklendi ve ardından her kuyucuğa 50µl substrat solüsyonu B eklendi. Plate yeni bir film ile kapatılarak 37°C'de 10 dakika karanlıkta bekletildi. Son olarak kuyucuklara 50µl stop solüsyonu eklendi. Kuyucuklardaki mavi rengi sarıya dönüştüğü görüldü. Plate bekletilmeden ELISA plate

okuyucuda 450 nm absorbans değeriinde ölçüldü ve kuyucukların OD değeri belirlendi.

ELISA analizinde konsantrasyonları bilinen standart çözelti solüsyonlarının kullanılması esastır. ELISA cihazı standart çözeltileri okur ve bunların OD değeri belirlir. Her OD değeri standart solüsyondaki bilinen konsantrasyona özğüdür. Buna göre standartların OD değeri Y eksenine ve konsantrasyon değeri X eksenine yerleştirilerek bir standart eğri çizilir. Bu hesaplama bilgisayar uygulaması (software) kullanılarak gerçekleştirildi ve çizilen standart eğriye göre her bir kuyucuktaki örneğin protein konsantrasyonları belirlendi.

3.5.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel verilerin analizi için SPSS 22.0 ve GraphPad Prism9 programları kullanıldı. Verilerin istatistiksel tanımları ortalama±standart sapma, en düşük-en yüksek değeri olarak verildi. miRNA'ların standardize ekspresyon seviyeleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplandı.

Kategorik değişkenler ki-kare testi ile tanımlandı. Sürekli değişkenlerin uygunluk analizleri için Kolmogrov-Smirnov analizi yapıldı. Normal dağılıma uyan verilerin analizinde T testi, normal dağılıma uymayan verilerin değerlendirilmesinde Mann-Whitney U analizi kullanıldı. Normal dağılıma uyan bağımsız gruplar arasındaki karşılaştırmalar ANOVA testi ile yapıldı. Birden çok parameterin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi uygulandı. Analiz sonuçları ve hastaların klinik verileri parametrik Pearson Korelasyonu ile değerlendirildi. Ölçülen biyobelirteçlerin duyarlılık ve özğüllük değeriinin saptanması için ROC (Receiver Operator Characteristic) eğri analizi yapıldı. miRNA'ların hedef ve yolaklarının belirlenmesi için DIANA tools ve MiRWalk veri tabanlarından yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizlerin sonuçları $p<0,05$ ise anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya 24 OSHK tanısı almış hasta, 24 FA tanısı almış hasta, 20 sigara içen ve 20 sigara içmeyen sağlıklı kontrol dahil edildi. Hastaların ve sağlıklı kontrol gruplarının tükürük örneklerinde miR-9, miR-34a ve miR-196a miRNA'larının ekspresyon seviyeleri incelendi. Kantitatif PZR'da elde edilen Ct değerleri normalizatör olarak housekeeping gen U6 kullanılarak standardize edildi ve miRNA'ların ekspresyon seviyeleri belirlendi. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının serum örneklerinden ise survivin, CIP2A ve β -katenin proteinlerinin düzeyleri araştırıldı.

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi

OSHK hasta grubunun yaş ortalaması $54,52 \pm 10,7$, FA hasta grubunun yaş ortalaması $20,03 \pm 5,87$, sigara içen sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması $42,15 \pm 9,42$ ve sigara içmeyen sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması $41,56 \pm 9,48$ olarak belirlendi. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarının normal dağılım gösterdikleri saptandı ($p=0,37$) ve gruplar arasındaki yaş farkı anlamlı bulunmadı ($p=0,22$). Çalışmamızda dahil edilen OSHK, FA ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Demografik Verileri

Özellik	OSHK Hastaları	FA Hastaları	Sigara İçmeyen Kontrol Grubu	Sigara İçen Kontrol Grubu
Sayı (n)	24	24	20	20
Yaş (en düşük-en yüksek)	31-67	14-32	25-64	25-53
Yaş (Ort. $\pm$ SS)	54.52 ± 10.7	20.03 ± 5.87	$42,15 \pm 9,4$	42.31 ± 11.05
Cinsiyet				
Erkek	14 [%58,3]	14 [%58,3]	10 [%50]	8 [%40]
Kadın	10 [%41,7]	10 [%41,6]	20 [%50]	12 [%60]
Sigara Kullanımı				
Evet	16 [%66,6]	0	20 [%100]	
Hayır	8 [%33,7]	22 [%100]		20 [%100]
Ağız Hijyeni				
Kötü	10 [%41,6]	14	11 [%55]	14 [%70]
İyi	14 [%58,3]	8	9 [%45]	6 [%30]
Ağız Yarası				
Var	19 [%79,1]	9 [%37,5]	4 [%20]	10 [%50]
Yok	5 [%20,9]	15 [%62,5]	16 [%80]	10 [%50]

Ort.: Ortalama, SS: Standart Sapma

OSHK hastalarının tümör boyutu, T evrelemesi, lenf nodu metastazı, diferansiyasyon derecesi, invazyon derinliği, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, kemoterapi (KT) yanıtı, radyoterapi (RT) yanıtı ve progresyon klinik parametrelerine ait veriler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4-2: OSHK Hastalarının Klinik Parametrelerine Ait Veriler

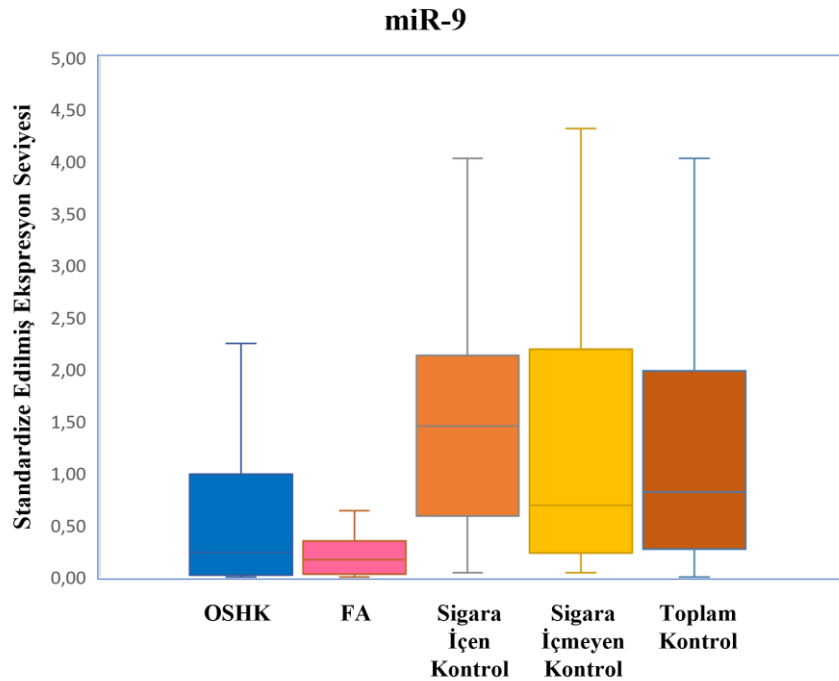
OSHK Hastalarının Klinik Verileri	Sayı (yüzde)
Tümör Boyutu	
<2 cm	3 [%12,5]
2-3 cm	15 [%62,5]
>4 cm	6 [%25]
Tümör Evresi (T evresi)	
T1, T2	17 [%70,8]
T3, T4	6 [%29,2]
Lenf Nodu Metastazı	
Var	9 [%37,5]
Yok	15 [%62,5]
Diferansiyasyon Derecesi	
Zayıf	1 [%4,1]
Orta	16 [%66,6]
İyi	5 [%20,8]
İnvazyon Derinliği	
<10mm	8 [%33,3]
>10mm	16 [%66,7]
Perinöral İnvazyon	
Var	14 [%58,3]
Yok	10 [%41,6]
Lenfovasküler İnvazyon	
Var	9 [%37,5]
Yok	15 [%62,5]
KT Yanıtı	
Var	5 [%45,4]
Yok	6 [%54,6]
RT Yanıtı	
Var	8 [%57,1]
Yok	6 [%42,8]
Progresyon	
Var	7 [%35]
Yok	13 [%65]

4.2. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-9, miR-34a ve miR-196a'nın Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-9, miR-34a ve miR-196a'nın ekspresyon seviyeleri belirlenirken kantitatif PZR'da elde edilen Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplandı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplanmasında normalizatör olarak housekeeping gen U6 ekspresyonları kullanılarak miR-9, miR-34a ve miR-196a'nın ekspresyon seviyeleri standardize edildi. Sonuçlar değerlendirilirken standardize edilmiş ekspresyon seviyeleri dikkate alındı.

4.2.1. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Standardize edilmiş miR-9 ekspresyon seviyelerinin ortalaması, OSHK hasta grubunda $0,97 \pm 2,28$, FA hastalarında $0,32 \pm 1,87$, sigara içen sağlıklı kontrol grubunda $2,13 \pm 3,37$ ve sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubunda $2,57 \pm 3,2$ olarak saptandı. Sağlıklı kontrol grupları birlikte alındığında miR-9 ekspresyon seviyesi $2,47 \pm 2,3$ olarak belirlendi. OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının standardize edilmiş miR-9 ekspresyon seviyelerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4-1: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-9 ekspresyon seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

Sigara içmeyen ve sigara içen sağlıklı kontrol grupları ile karşılaştırıldığında OSHK hastalarında miR-9 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p=0.028$ ve $p=0.003$). Sağlıklı kontrol grubu birlikte alındığında OSHK hastalarında miR-9 seviyesinin anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p=0,010$). Bu değerlendirmede $2^{-\Delta\Delta Ct}$ hesaplaması sigara içen ve sigara içmeyen sağlıklı kontrollerin ortalaması dikkate alınarak yapıldı.

Sigara içen ve sigara içmeyen kontrol grupları arasında miR-9 ekspresyon seviyesi bakımından anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p=0.25$). OSHK hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-9 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4-3: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.* $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
miR-9	OSHK	0,97 $\pm$ 2,28	0,01-9,78	0,010
	Toplam Kontrol (40)	2,47 $\pm$ 2,3	0,26-12-64	
	OSHK			0,003
	Sigara İçen (20)	2,13 $\pm$ 3,37	0,26-12,64	
	OSHK			0,028
	Sigara İçmeyen (20)	2,57 $\pm$ 3,2	0,4-10,27	
	Sigara İçen (20)			0,56
	Sigara İçmeyen (20)			

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *miR-9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalaması; $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarının klinik parametreleri ve miR-9 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da tümör boyutu arttıkça miR-9 ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlendi ($p=0,29$). Lenf nodu metastazının varlığında miR-9 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0,04$). İnvazyon derinliği, tümör diferansiyasyonu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, RT yanıtı, KT yanıtı ve tümör progresyonu ile miR-9 ekspresyon seviyeleri

arasında ilişki saptanmadı ($p>0,05$). OSHK hastalarının klinik parametreleri ile standardize edilmiş miR-9 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4-4: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

OSHK Hastalarının Klinik Verileri	*p
Tümör Boyutu (>4 cm)	0,15
Tümör Evresi (T3 ve T4)	0,35
Lenf Nodu Metastazı (+)	0,04
İnvazyon Derinliği (>10 mm)	0,24
Perinöral İnvazyon (+)	0,72
Lenfovasküler İnvazyon (+)	0,93
KT Yanıtı (Var)	0,97
RT Yanıtı (Var)	0,07
Progresyon (+)	0,09
Tümör Boyutu (>4 cm)	0,79

*p değerleri klinik bulguları taşıyan ve taşımayanların miR-9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ortalamaları karşılaştırılarak hesaplandı; $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

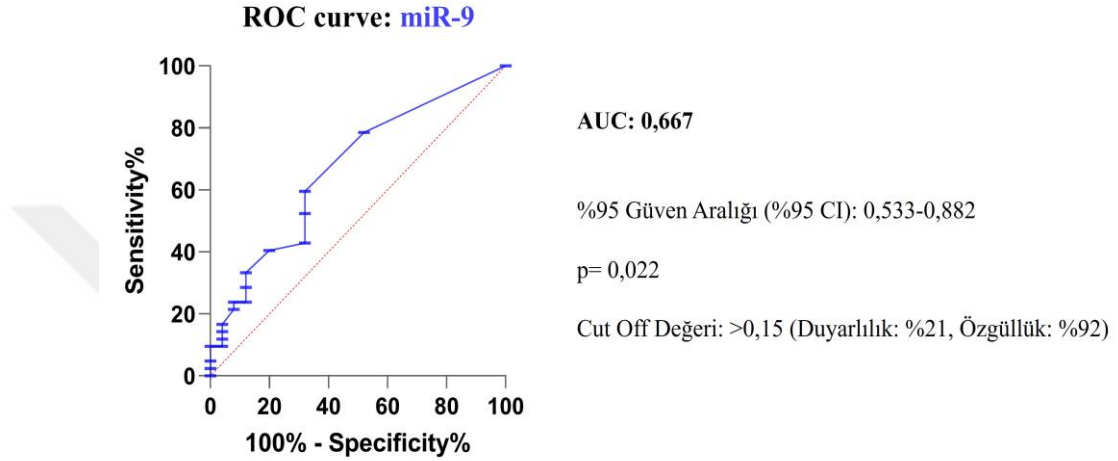
FA hastaları ve OSHK hastalarının miR-9 seviyeleri arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı ($p=0,71$). Ancak mir-9 ekspresyon seviyesinin FA hastalarında kontrol gruplarına göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0.017$). FA hastaları, sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastalarının miR-9 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4-5: FA hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile miR-9 Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.* $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
miR-9	FA	0,32 $\pm$ 1,87	0-1,79	0,017
	Toplam Kontrol (40)	2,47 $\pm$ 2,3	0,26-12-64	
	FA			0,71
	OSHK	0,97 $\pm$ 2,28	0,01-9,78	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *miR-9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalaması; $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarında miR-9 ekspresyonundaki azalmanın OSHK açısından duyarlılık ve özgüllük oranlarının (tanısal doğruluğunun) hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizleri yapıldı ve AUC değeri hesaplandı. OSHK hastalarında tükürük miR-9 seviyeleri için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,667 olarak bulundu ve miR-9 düşük tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirildi. Yapılan ROC eğrisinin grafiği şekil 4.2’de verilmiştir.

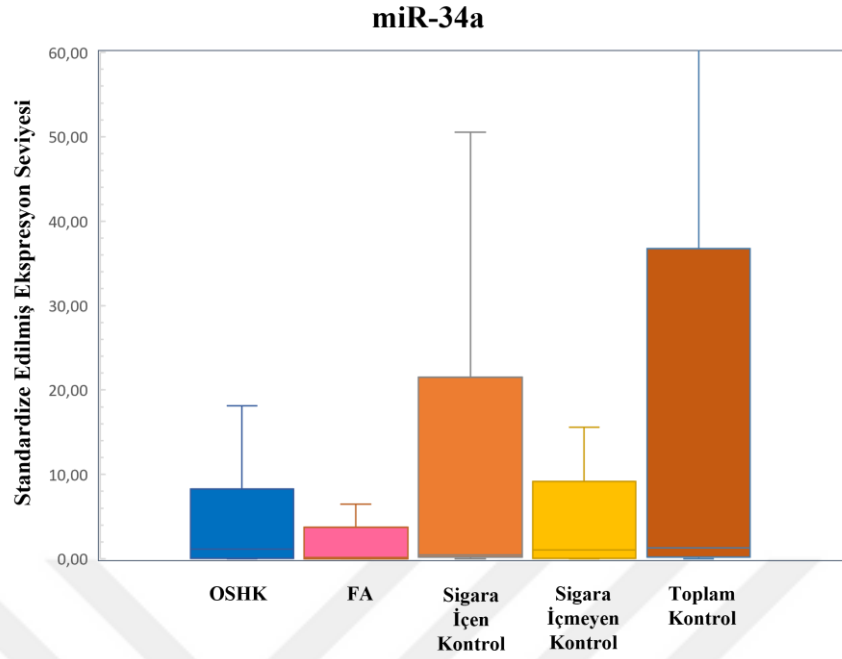


Şekil 4-2: miR-9 ROC Eğrisi

miR-9 ekspresyon seviyeleri ile hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0.05$).

4.2.2. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Standardize edilmiş miR-34a ekspresyon seviyelerinin ortalaması, OSHK hasta grubunda $6,04 \pm 23,33$, FA hastalarında $2,68 \pm 23,56$, sigara içen kontrol grubunda $20,21 \pm 31,89$ ve sigara içmeyen kontrol grubunda $15,61 \pm 34,21$ olarak saptandı. Kontrol grupları birlikte alınarak yapılan hesaplamalarda miR-34a ekspresyon seviyesi $17,80 \pm 32,39$ olarak belirlendi. OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının standardize edilmiş miR-34a ekspresyon seviyelerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.3’te verilmiştir.



Şekil 4-3: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-34a ekspresyon seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

OSHK hastalarında sigara içmeyen kontrol grubuna göre miR-34a ekspresyon seviyelerinin azalmış olduğu belirlendi ancak istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,069$). Sigara içen kontrol grubuna göre OSHK hastalarında miR-34a ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p=0,029$). Sigara içen ve içmeyen kontroller arasında miR-34a ekspresyon seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,66$). Sigara içen ve içmeyen sağlıklı kontroller birlikte değerlendirilerek yapılan hesaplamalar sonucunda; OSHK hastalarında kontrollere göre miR-34a ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü ($p=0,012$). OSHK hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-34a ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4-6: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.* $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
miR-34a	OSHK	6,04 $\pm$ 23,33	0,00-56,89	0,012
	Toplam Kontrol (40)	17,98 $\pm$ 30,80	0,03-133,14	
	OSHK		0,00-56,89	0,029
	Sigara İçen (20)	20,21 $\pm$ 31,89	0,03-127,12	
	OSHK			0,069
	Sigara İçmeyen (20)	15,61 $\pm$ 34,21	0,4-133,14	
	Sigara İçen (20)	20,21 $\pm$ 31,89		0,66
	Sigara İçmeyen (20)	15,61 $\pm$ 34,21		

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *miR-34a 2^{-ΔΔCt} değerlerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarının klinik parametreleri ve miR-34a ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. Tümör evresi yüksek ve lenf nodu metastazı olanlarda miR-34a ekspresyon seviyesinin azaldığı belirlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,08 ve p=0,06). Lenf nodu metastazı, invazyon derinliği, tümör diferansiyasyonu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, RT yanıtı, KT yanıtı ve tümör progresyonu ile miR-34a ekspresyon seviyeleri arasında ilişki saptanmadı (p>0,05). OSHK hastalarının klinik parametreleri ile standardize edilmiş miR-34a ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4-7: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

OSHK Hastalarının Klinik Verileri	*p
Tümör Boyutu	0,08
Tümör Boyutu (>4 cm)	0,38
Tümör Evresi (T3 ve T4)	0,34
Lenf Nodu Metastazı (+)	0,87
İnvazyon Derinliği (>10 mm)	0,058
Perinöral İnvazyon (+)	0,08
Lenfovasküler İnvazyon (+)	0,21
KT Yanıtı (Var)	0,07
RT Yanıtı (Var)	0,99
Progresyon (+)	0,16

*p değerleri klinik bulguları taşıyan ve taşımayanların miR-34a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ortalamaları karşılaştırılarak hesaplandı; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

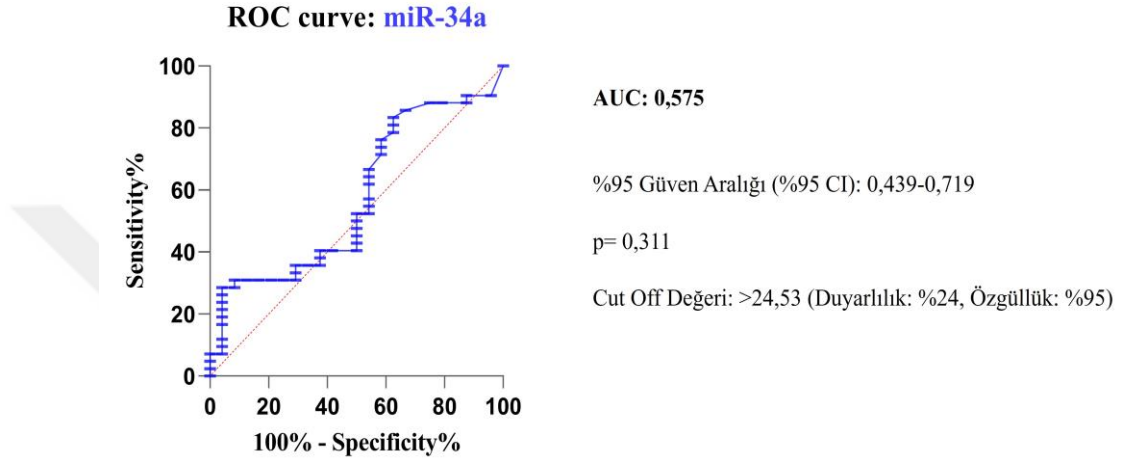
FA hastalarında OSHK hastaları gibi miR-34a seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olduğu belirlendi (p=0.014), FA ve OSHK hastaları arasında ise anlamlı farklılık saptanmadı (p=0,78). FA hastalarının sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastaları ile miR-34a ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4-8: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile miR-34a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Grup	Ort.*±SS	En Düşük-En Yüksek	p
FA	2,68±23,56	0-12,21	0,014
Toplam Kontrol (40)	17,98±30,80	0,03-133,14	
miR-34a			
FA			0,78
OSHK	6,04±23,33	0,00-56,89	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *miR-34a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarında miR-34a ekspresyonundaki azalmanın OSHK açısından duyarlılık ve özgüllük oranlarının (tanısal doğruluğunun) hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizleri yapıldı ve AUC değeri hesaplandı. OSHK hastalarında tükürük miR-34a seviyeleri için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,575 olarak bulundu ve miR-34a düşük tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirildi. Yapılan ROC analizinin grafiği şekil 4.4'te verilmiştir.

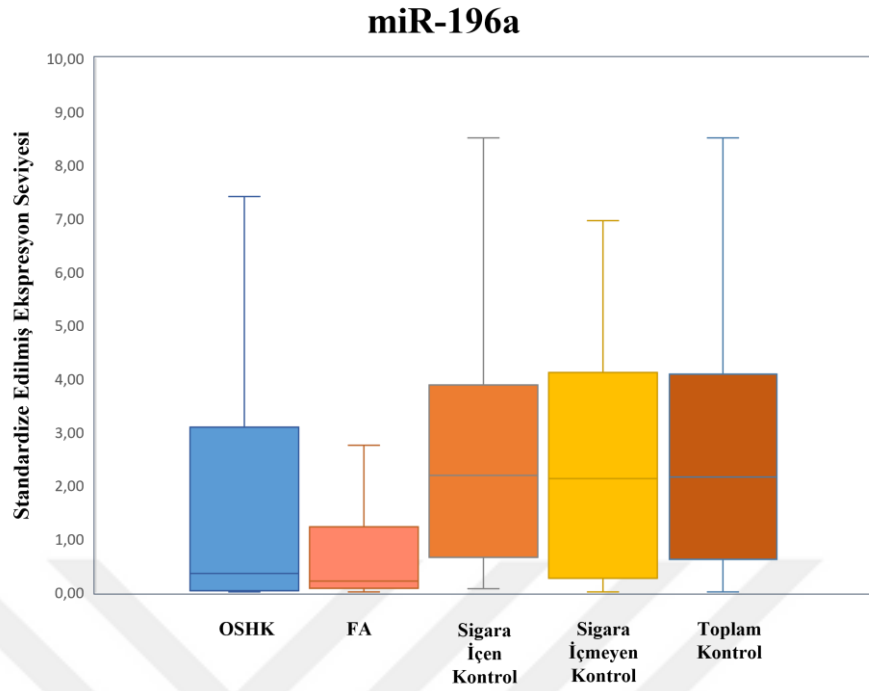


Şekil 4-4: miR-34a ROC Eğrisi

miR-34a ekspresyon seviyeleri ile hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0.05$).

4.2.3. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Standardize edilmiş miR-196a ekspresyon seviyelerinin ortalaması, OSHK hasta grubunda $3,95\pm19,9$, FA hastalarında $1,20\pm26,47$, sigara içen kontrol grubunda $2,3\pm32,96$ ve sigara içmeyen kontrol grubunda $2,60\pm27,03$ olarak saptandı. Kontrol grupları birlikte alınarak yapılan hesaplamalarda miR-196a ekspresyon seviyesi $2,52\pm29,93$ olarak belirlendi. OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının standardize edilmiş miR-196a ekspresyon seviyelerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4-5: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-196a ekspresyon seviyelerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

OSHK hastalarında sigara içen ve sigara içmeyen kontrol grubuna göre miR-196a ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,14$ ve $p=0,13$). Sigara içen ve içmeyen kontroller arasında miR-196a ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,44$). Sigara içen ve içmeyen sağlıklı kontroller birlikte değerlendirilerek yapılan hesaplamalar sonucunda; OSHK hastalarında kontrollere göre miR-196a ekspresyon seviyesinin arttığı belirlendi ancak istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p=0,057$). OSHK hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının miR-196a ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4-9: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.*±SS	En Düşük-En Yüksek	p
miR-196a	OSHK	3,95±19,9	0,01-63,12	0,057
	Toplam Kontrol (40)	2,52±29,93	0,03-8,51	
	OSHK			0,14
	Sigara İçen (20)	2,3±32,96	0,03-127,12	
	OSHK			0,13
	Sigara İçmeyen (20)	2,60±27,03	0,07-6,96	
	Sigara İçen (20)	2,3±32,96		0,44
	Sigara İçmeyen (20)	2,3±32,96		

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *miR-196a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarının klinik parametreleri ve miR-196a ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı. OSHK hastalarının tümör boyutu, lenf nodu metastazı, invazyon derinliği, tümör diferansiyasyonu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, RT yanıtı, KT yanıtı ve tümör progresyonu ile miR-196a ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı (p>0,05). OSHK hastalarının klinik parametreleri ile standardize edilmiş miR-196a ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4-10: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

OSHK Hastalarının Klinik Verileri	*p
Tümör Boyutu (>4 cm)	0,067
Tümör Evresi (T3 ve T4)	0,48
Lenf Nodu Metastazı (+)	0,67
İnvazyon Derinliği (>10 mm)	0,07
Perinöral İnvazyon (+)	0,34
Lenfovasküler İnvazyon (+)	0,76

KT Yanıtı (Var)	0,88
RT Yanıtı (Var)	0,06
Progresyon (+)	0,73

FA hastaları ve OSHK hastalarının miR-196a seviyeleri arasında anlamlı derecede farklılık saptanmadı ($p=0,77$). miR-196a ekspresyon seviyelerinin FA hastalarında toplam kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p=0,09$). FA hastalarının kontrol grupları ve OSHK hastaları ile miR-196a ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4-11: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile miR-196a Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.* $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
	FA	1,09 $\pm$ 27,04	0,01-9,45	0,09
	Toplam Kontrol (40)	2,33 $\pm$ 22,94	0,03-8,51	
miR-196a	FA	1,09 $\pm$ 27,04	0,01-9,45	0,12
	OSHK	3,7 $\pm$ 20,76	0,01-63,12	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *miR-196a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin ortalaması; $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

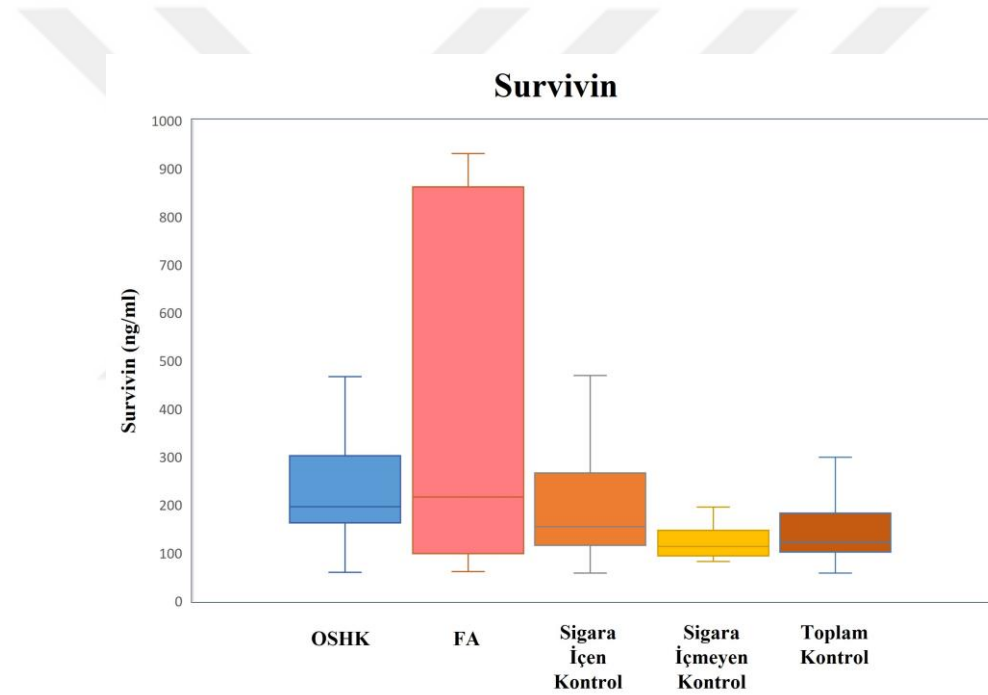
miR-196a ekspresyon seviyeleri ile hasta ve kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0,05$).

4.3. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında Survivin, CIP2A ve β -katenin Proteinlerinin Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi

OSHK hastaları, FA hastaları ve kontrol gruplarında survivin, CIP2A ve β -katenin protein düzeyleri; her protein için belirli bir konsantrasyonda hazırlanan farklı dilüsyon oranlarına sahip standart solüsyonların verdikleri absorbans değerine göre çizilen eğri ile değerlendirilerek hesaplandı.

4.3.1. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında Survivin Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Serum survivin düzeylerinin ortalaması OSHK hasta grubunda $232,11 \pm 133,96$ ng/ml, FA hastalarında $427,13 \pm 310,8$ ng/ml, sigara içen kontrol grubunda $186,77 \pm 101,51$ ng/ml ve sigara içmeyen kontrol grubunda $121,92 \pm 51,99$ ng/ml olarak saptandı. Kontrol grupları birlikte alınarak yapılan hesaplamalarda survivin düzeyleri $154,34 \pm 82,10$ ng/ml olarak belirlendi. OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının serum survivin düzeylerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4-6: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının survivin düzeylerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

OSHK hastalarında sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubuna göre survivin düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,015$), sigara içen kontrollerle karşılaştırıldığında ise anlamlı fark saptanmadı ($p=0,25$).

Sigara içen kontrollerin survivin düzeylerinde sigara içmeyen kontrollerin survivin düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0,03$).

Sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastalarının survivin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4-12: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grup	Ort.*±SS	En Düşük-En Yüksek	p
OSHK			0,25
Sigara İçen (20)	186,77±101,51	57,63-469,11	
OSHK			0,01
Sigara İçmeyen (20)	121,92±51,99	87,12-181,87	
Sigara İçen (20)	186,77±101,51	57,63-469,11	0,03
Sigara İçmeyen (20)	121,92±51,99	87,12-181,87	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *Survivin (mg/ml) düzeylerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarının klinik parametreleri ve survivin düzeyleri karşılaştırıldı. OSHK hastalarının tümör boyutu, lenf nodu metastazı, invazyon derinliği, tümör diferansiyasyonu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, RT yanıtı, KT yanıtı ve tümör progresyonu ile survivin düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). OSHK hastalarının klinik parametreleri survivin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4-13: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması

OSHK Hastalarının Klinik Verileri	*p
Tümör Boyutu	0,31
Tümör Evresi (T evresi)	0,23
Lenf Nodu Metastazı	0,72
Diferansiyasyon Derecesi	0,84
İnvazyon Derinliği	0,95
Perinöral İnvazyon	0,45

Lenfovasküler İnvazyon	0,22
KT Yanıtı	0,08
RT Yanıtı	0,09
Progresyon	0,14

*p değerleri klinik bulguları taşıyan ve taşımayanların survivin (ng/ml) ortalamaları karşılaştırılarak hesaplandı;
p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

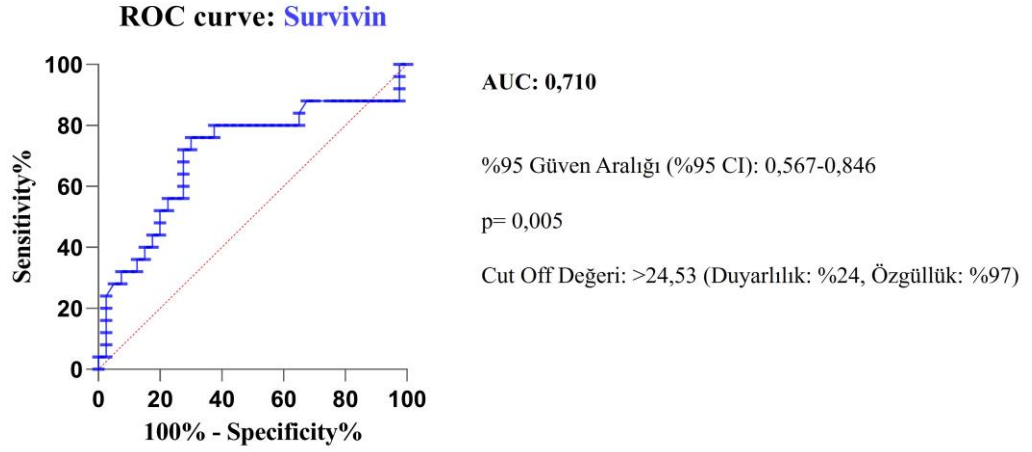
FA hastalarının survivin düzeyleri ve OSHK hastalarının survivin düzeylerine göre anlamlı derecede artmış bulundu ($p=0,027$). Survivin düzeylerinin FA hastalarında sigara içen ve içmeyen sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu belirlendi ($p=0,028$ ve $p=0.01$). FA hastalarının sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastaları ile survivin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.14’de verilmiştir.

Tablo 4-14: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort. $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
Survivin	FA	427,13 $\pm$ 310,8	65,83-931,82	0,001
	Toplam Kontrol (40)	154,34 $\pm$ 82,10	57,63-469,11	
	FA			0,028
	Sigara İçen (20)	186,77 $\pm$ 101,51	57,63-469,11	
	FA			0,001
	Sigara İçmeyen (20)	121,92 $\pm$ 51,99	87,12-181,87	
	FA			0,028
	OSHK	232,11 $\pm$ 133,96	59,01-554,61	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * Survivin (mg/ml) düzeylerinin ortalaması; $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarında survivin düzeylerindeki yükselmenin OSHK açısından duyarlılık ve özgüllük oranlarının (tanısal doğruluğunun) hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizleri yapıldı ve AUC değeri hesaplandı. OSHK hastalarında serum survivin düzeyleri için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,710 olarak bulundu ve survivin orta tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirildi. Yapılan ROC analizinin grafiği şekil 4.7’de verilmiştir.

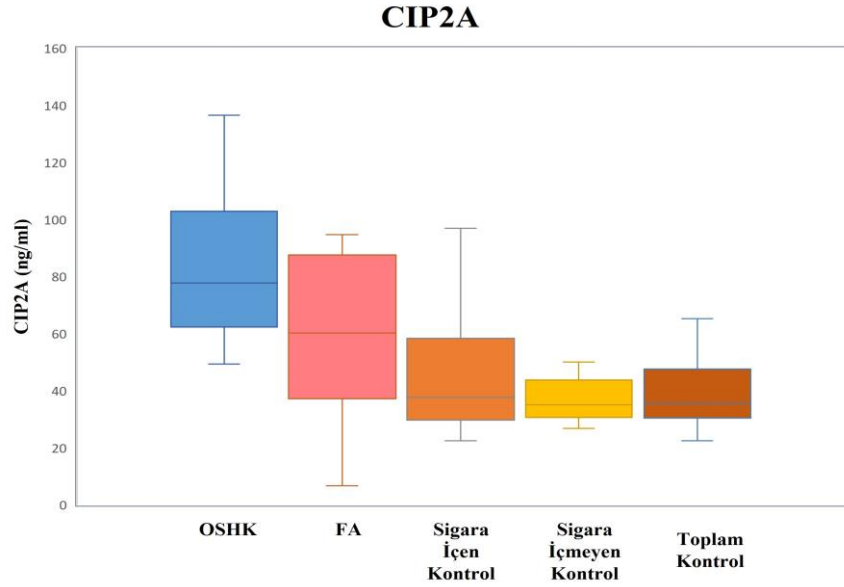


Şekil 4-7: Survivin ROC Eğrisi (OSHK hastaları ve tüm kontroller birlikte değerlendirildi).

Survivin düzeyleri ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0.05$).

4.3.2. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında CIP2A Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Serum CIP2A düzeylerinin ortalaması OSHK hasta grubunda $89,04 \pm 35,05$ ng/ml, FA hastalarında $67,83 \pm 46,45$ ng/ml, sigara içen kontrol grubunda $51,5 \pm 33,73$ ng/ml ve sigara içmeyen kontrol grubunda $41,88 \pm 26,81$ ng/ml olarak saptandı. Kontrol grupları birlikte alınarak yapılan hesaplamalarda CIP2A düzeyleri $46,69 \pm 28,58$ ng/ml olarak belirlendi. OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının serum CIP2A düzeylerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4-8: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının CIP2A düzeylerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

OSHK hastalarında, sigara içen ve sigara içmeyen kontrol grubuna göre CIP2A düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$ ve $p<0,001$). Sigara içen ve içmeyen kontroller birlikte değerlendirildiğinde; OSHK hastalarında CIP2A düzeyleri belirgin ölçüde daha yüksek bulundu ($p<0,001$).

Sigara içen ve sigara içmeyen kontrollerin CIP2A düzeyleri arasında farklılık bulunmadı ($p=0,29$). Sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastalarının CIP2A düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4-15: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının CIP2A Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.*±SS	En Düşük-En Yüksek	p
CIP2A	OSHK	89,04±35,05	49,29-121,97	< 0,001
	Toplam Kontrol (40)	46,69±28,58	22,5-145,5	
	OSHK			< 0,001
	Sigara İçen (20)	51,5±33,73	28,7-123,1	
	OSHK		22,5-145,5	< 0,001
	Sigara İçmeyen (20)	41,88±26,81		
	Sigara İçen (20)	51,5±33,73		0,29
	Sigara İçmeyen (20)	41,88±26,81		

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *CIP2A (mg/ml) düzeylerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarının klinik parametreleri ve CIP2A düzeyleri karşılaştırıldı. OSHK hastalarının tümör boyutu, lenf nodu metastazı, invazyon derinliği, tümör diferansiyasyonu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, RT yanıtı, KT yanıtı ve tümör progresyonu ile CIP2A düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı (p>0,05). OSHK hastalarının klinik parametreleri CIP2A düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.16'de verilmiştir.

Tablo 4-16: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile CIP2A Düzeylerinin Karşılaştırılması

OSHK Hastalarının Klinik Verileri	*p
Tümör Boyutu	0,31
Tümör Evresi (T evresi)	0,23
Lenf Nodu Metastazı	0,72

Diferansiyasyon Derecesi	0,84
İnvazyon Derinliği	0,95
Perinöral İnvazyon	0,45
Lenfovasküler İnvazyon	0,22
KT Yanıtı	0,08
RT Yanıtı	0,09
Progresyon	0,14

*p değerleri klinik bulguları taşıyan ve taşımayanların CIP2A (ng/ml) ortalamaları karşılaştırılarak hesaplandı;

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

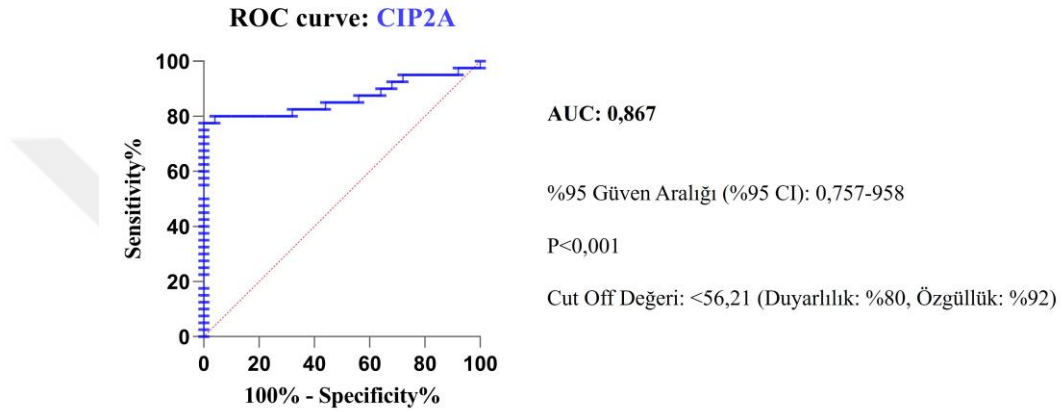
FA hastalarının ile OSHK hastalarının CIP2A düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı (p=0,67). FA hastalarının CIP2A düzeyleri ile sağlıklı kontroller arasında anlamlı fark bulunmadı (p=0,223). FA hastalarının sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastaları ile CIP2A düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4-17: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile CIP2A Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.*±SS	En Düşük-En Yüksek	p
CIP2A	FA	67,83±46,45	34,1-90,7	0,223
	Toplam Kontrol (40)	46,69±28,58	22,5-145,5	
	FA			0,226
	Sigara İçen (20)	51,5±33,73	28,7-123,1	
	FA			0,211
	Sigara İçmeyen (20)	41,88±26,81	22,5-145,5	
	FA			0,67
	OSHK	89,04±35,05	59,01-554,61	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, *CIP2A (mg/ml) düzeylerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarında CIP2A düzeylerindeki yükselmenin OSHK açısından duyarlılık ve özgüllük oranlarının (tanısal doğruluğunun) hesaplanabilmesi için ROC eğrisi analizleri yapıldı ve AUC değeri hesaplandı. OSHK hastalarında serum CIP2A düzeyleri için yapılan ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,710 olarak bulundu ve CIP2A yüksek tanısal doğrulukta ayırt edici bir parametre olarak değerlendirildi. Yapılan ROC analizinin grafiği şekil 4.9’da verilmiştir.

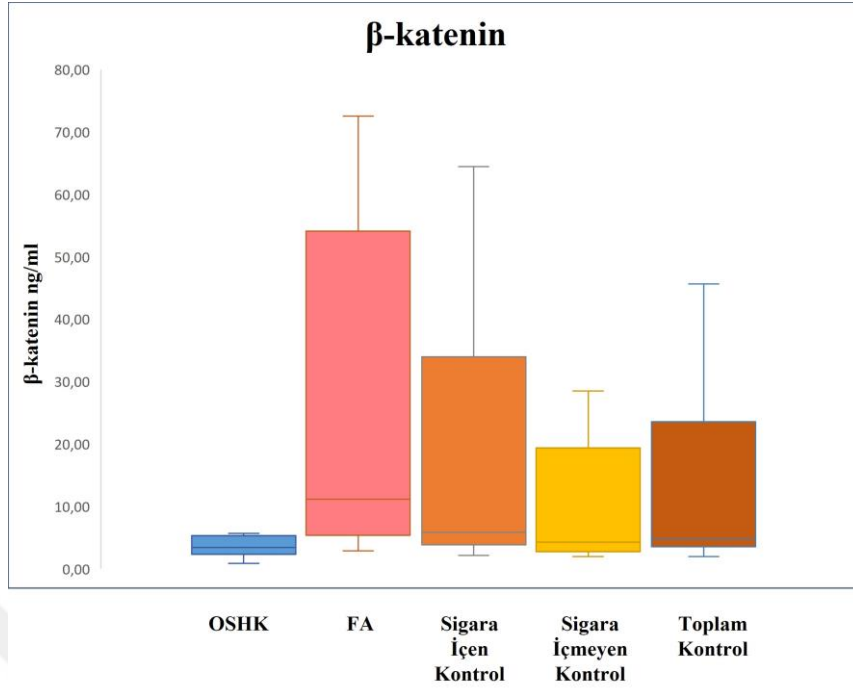


Şekil 4-9: CIP2A ROC Eğrisi

CIP2A düzeyleri ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0.05$).

4.3.3. OSHK Hastaları, FA Hastaları ve Kontrol Gruplarında β -katenin Serum Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Serum β -katenin düzeylerinin ortalaması OSHK hasta grubunda 9.5 ± 13.8 ng/ml, FA hastalarında 26.9 ± 25.5 ng/ml, sigara içen kontrol grubunda $15,93 \pm 33,16$ ng/ml ve sigara içmeyen kontrol grubunda $13,41 \pm 30,89$ olarak saptandı. Kontrol grupları birlikte alınarak yapılan hesaplamalarda β -katenin düzeyleri $14.67 \pm 32,0$ ng/ml olarak belirlendi. OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının serum β -katenin düzeylerinin ortalamalarına ait grafik Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4-10: OSHK hastaları, FA hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarının β-katenin düzeylerinin grafiği (ortalama±standart sapma).

OSHK hastalarının β-katenin düzeylerinin sigara içmeyen sağlıklı kontrol grubuna göre azalmış olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,22$). OSHK hastalarının β-katenin düzeyleri sigara içen kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azalmış bulundu ($p=0,03$).

Sigara içen ve içmeyen sağlıklı kontrollerin β-katenin düzeyleri arasında fark saptanmadı ($p=0,28$). Sigara içen ve içmeyen kontroller birlikte değerlendirildiğinde; OSHK hastalarında β-katenin düzeyleri anlamlı ölçüde azalmış bulundu ($p=0,034$). Sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastalarının β-katenin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4-18: OSHK Hastaları ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının β -katenin Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort.* $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
β-katenin	OSHK	9.5 $\pm$ 13.8	1,91-50,84	0,034
	Toplam Kontrol (40)	14.67 $\pm$ 32,0	1,94-69,04	
	OSHK			0,03
	Sigara İçen (20)	15,93 $\pm$ 33,16	2,17-64,46	
	OSHK			0,22
	Sigara İçmeyen (20)	13,41 $\pm$ 30,89	1,94-69,04	
	Sigara İçen (20)	15,93 $\pm$ 33,16		0,28
	Sigara İçmeyen (20)	13,41 $\pm$ 30,89		

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * β -katenin (mg/ml) düzeylerinin ortalaması; p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

OSHK hastalarının klinik parametreleri ve β -katenin düzeyleri karşılaştırıldı. OSHK hastalarının tümör boyutu, lenf nodu metastazı, invazyon derinliği, tümör diferansiyasyonu, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon, RT yanıtı, KT yanıtı ve tümör progresyonu ile β -katenin düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı (p>0,05). OSHK hastalarının klinik parametreleri β -katenin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.16’de verilmiştir.

Tablo 4-19: OSHK Hastalarının Klinik Parametreleri ile β -katenin Düzeylerinin Karşılaştırılması

OSHK Hastalarının Klinik Verileri	*p
Tümör Boyutu	0,31
Tümör Evresi (T evresi)	0,23
Lenf Nodu Metastazı	0,72
Diferansiyasyon Derecesi	0,84
İnvazyon Derinliği	0,95

Perinöral İnvazyon	0,45
Lenfovasküler İnvazyon	0,22
KT Yanıtı	0,08
RT Yanıtı	0,09
Progresyon	0,14

*p değerleri klinik bulguları taşıyan ve taşımayanların β -katenin (ng/ml) ortalamaları karşılaştırılarak hesaplandı;
 $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

FA hastalarının β -katenin düzeyleri OSHK hastalarından anlamlı ölçüde daha yüksek bulundu ($p=0,034$). FA hastalarında β -katenin düzeylerinin toplam sağlıklı kontrollere göre yüksek saptandı ($p=0,008$). FA hastalarının sağlıklı kontrol grupları ve OSHK hastaları ile β -katenin düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 4.20’de verilmiştir.

Tablo 4-20: FA Hastalarının Sağlıklı Kontrol Grupları ve OSHK Hastaları ile β -katenin Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Grup	Ort. $\pm$ SS	En Düşük-En Yüksek	p
β-katenin	FA	26.9 $\pm$ 25.5	34,1-190,7	0,008
	Toplam Kontrol (40)	14.67 $\pm$ 32,0	1,94-69,04	
	FA			0,05
	Sigara İçen (20)	15,93 $\pm$ 33,16	2,17-64,46	
	FA			0,041
	Sigara İçmeyen (20)	13,41 $\pm$ 30,89	1,94-69,04	
	FA			0,01
	OSHK	9.5 $\pm$ 13.8	1,91-50,84	

Ort: Ortalama, SS: Standart sapma, * β -katenin (mg/ml) düzeylerinin ortalaması; $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

β -katenin düzeyleri ile hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının demografik verileri (yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, ağız hijyeni ve ağız yarası) ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p > 0.05$).

4.4. OSHK Hastalarındaki miR-9 ve miR-34 Ekspresyon Seviyeleri ile Survivin ve CIP2A Protein Düzeylerinin Birlikte Değerlendirilmesi

OSHK tükürük miR-34a seviyelerindeki azalma ile survivin serum düzeylerindeki artış arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı ($p=0,005$). Yapılan korelasyon analizinin sonuçları Tablo 4.21’de verilmiştir.

Tablo 4-21: OSHK Hastalarında miR-34a Ekspresyonu ve Survivin Düzeylerinin Karşılaştırılması

miR-34a ve Survivin Korelasyonu
R _s : 0,422
p= 0,005
Covariance= 63,08
R= 0,422

$p<0,05$ anlamlı kabul edildi.

miR34a seviyeleri CIP2A düzeyleri ile ilişkili bulunmazken ($p>0,05$), miR-9 ekspresyon seviyelerindeki azalma ile survivin ve CIP2A düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

OSHK ağız mukozasındaki skuamöz epitel hücrelerden kaynaklanan malign neoplazmdır ve global bir sağlık sorunudur. Yeni tedavilerin geliştirilmesine rağmen OSHK'a bağı ölüm oranları hızla artmaya devam etmektedir (Yan ve ark. 2018). Sigara ve alkol kullanımı, kötü ağız hijyeni, HPV enfeksiyonu, ağız içinde yara gelişimi ve Fankoni anemisi OSHK için risk faktörlerindendir (Rishabh ve ark. 2021). OSHK'da en efektif tedavi seçeneği erken evrede cerrahi müdahaledir. Erken evresinde (Evre I) tedavi sonrası sağkalım %80-90 oranlarında iken, ileri evrelerde (Evre IV) sağkalım oranı %30'lara kadar düşmektedir.

FA DNA onarım genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile gelişen nadir bir kemik iliği yetmezlik sendromudur. FA hastalarında genel popülasyona göre yüksek oranda kanser gelişim yatkınlığı vardır (Singh ve Andi 2017). FA hastalarında en yaygın görülen kanserlerin başında OSHK gelmektedir (Kutler ve ark. 2012). FA hastalarının OSHK gelişimi açısından düzenli olarak kontrol edilmeleri gerekmektedir.

PI3K hücre içi sinyal yolağı hücre çoğalması, hücre iskeleti değişiklikleri, apoptoz, glikoz metabolizması, anjiyogenez ve kanser gelişiminde rol oynar (Lien ve ark., 2017). PI3K sinyal yolağındaki regülasyon bozuklukları OSHK ile ilişkili bulunmuştur (Pedrero ve Garcia 2005). PI3K sinyal yolağında görevli proteinlerin disregülasyonu OSHK gelişiminde, tümör invazyonu ve metastazında rol aldıkları gösterilmiştir (Yu ve ark. 2017).

Wnt sinyal yolağı kanserlerde hücrelerin çoğalması, farklılaşması, invazyonu ve metastazında etkindir ve bu yolağın OSHK gelişimi ile de ilişkili olduğu bilinmektedir (Ravindran ve ark. 2014). Wnt sinyal yolağındaki regülasyon bozuklukları OSHK'nın kötü prognozu ile ilişkili bulunmuştur. Wnt sinyali liganlarındaki anormal artışın, β -katenin yıkımı baskılanması ve β -katenin nükleer birikiminin oral karsinogenezi arttırdığı bilinmektedir (Reyes ve ark. 2020).

miRNA'ların mide kanseri, hepatoselüler karsinom, meme kanseri, glioblastoma, prostat kanseri ve kolorektal kanser, baş ve boyun kanserleri ve OSHK'da anormal şekilde eksprese edildikleri gösterilmiştir. Tümör gelişimini destekleyen

miRNA'lar onko-miR olarak sınıflandırılırken, tümör baskılayıcı özellikte olanlar tümör süpresör-miR olarak sınıflandırılır (Kinoshita ve ark. 2011). miR-155, miR-21, miR-31, miR-17, miR-15a, miR-223, miR-221 OSHK'da ekspresyonu artış gösteren, miR-126, miR-139, miR-34a, miR-203, miR-375, miR-137, miR-145 OSHK'da azalan miRNA'lara örnektir (Mazumder ve ark. 2019).

FA'sinde miRNA araştırmaları çok yenidir ve bu konuda yapılan az sayıdaki çalışmalar genellikle DNA tamiri, genom instabilitesi ve hematopoetik kök hücreler ile ilişkilidir (Natarajan ve ark. 2016; Rio ve ark. 2012). Bir çalışmada FA hastalarının global miRNA profillemesi yapılarak miRNA'ların FA patofizyolojisindeki rolü üzerine değerlendirmeler belirtilmiştir (Degan ve ark. 2019). FA hastalarında kanser gelişiminde etkili olabilecek miRNA'lar ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Bu tez çalışmasında PI3K ve Wnt sinyal yollarında rolü olan miR-9, miR-34a ve miR-196a'nın tükürükteki ekspresyon seviyelerinin ve survivin, CIP2A ve β -katenin proteinlerinin serum düzeylerinin araştırılması ile bu miRNA ve proteinlerin OSHK gelişim riski yüksek olan FA hastalarında ve sigara içen bireylerde biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışma planlanırken DIANA Tools ve miRWalk veri tabanlarından yararlanıldı ve literatür taraması yapıldı. Çalışmaya 24 OSHK hastası, 24 FA hastası ve kontrol grubu olarak 20 sigara içen (yüksek bağımlı) ve 20 sigara içmeyen sağlıklı gönüllü dahil edildi. miR-9, miR-34a ve miR-196a ekspresyon seviyeleri hastaların ve sağlıklı kontrollerin tükürük örneklerinden, survivin, CIP2A ve β -katenin protein düzeyleri ise serum örneklerinden ölçüldü. miRNA ekspresyon analizleri için normalizatör olarak bir housekeeping gen olan U6 snRNA (hsa) kullanıldı. Sonuçlar yorumlanırken sigara içen bireyler OSHK geliştirme riski taşıdıkları için; kontrol grupları hem sigara içenler ve içmeyenler olarak ayrı ayrı, hem de toplam halinde değerlendirildi.

Çalışmamızda OSHK hastalarının yaş ortalaması $54,52 \pm 10,7$ olarak belirlendi. OSHK hastalarının %58,3'ü erkek, %41,7'si ise kadındı, %66'sında sigara kullanımı mevcuttu ve %79,1'inde ağız içinde yaraların olduğu tespit edildi. OSHK hastalarının demografik bulguları literatür ile uyumludur (Jerjes ve ark. 2010; Malik ve ark. 2016).

Çalışmamızdaki FA hastalarının yaş ortalamaları $20,03 \pm 5,87$, cinsiyet dağılımları ise %58,3 erkek, %41,6 kadın olarak belirlendi, %37,5'inde ağız içinde

yaraların varlığı dikkati çekti. Çalışma devam ederken hastalarımızın birinde karaciğer, birinde özafagus kanseri, bir hastada ise OSHK gelişimi görüldü.

miR-9 PI3K, Wnt sinyal yollarında görevli çok sayıda geni hedef alan, tümör gelişiminde önemli bir miRNA'dır ve miR-9'un çeşitli kanserlerin başlangıcındaki ve progresyonundaki rolü üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır. İnsan genomunda, üç bağımsız miR-9 öncüsü (miR-9-1, miR-9 2 ve miR-9-3) mevcuttur ve aynı olgun miR-9'u kodlar. miR-9 çoğalma, hücre hareketi, apoptoz ve metastaz ile ilişkili çok sayıda geni hedef alır. miR-9 deregülasyonu PI3K, Wnt, JAK/STAT, NOTCH1, Ras ve ERK sinyal yollarının aktivasyonlarını değiştirmektedir. Birçok kanserde miR-9'un anormal ekspresyonu gözlenmiştir ve karsinogeneizde belirgin fonksiyonu vardır (Kahafei ve ark. 2019) ancak miR-9'un kanser gelişiminde onkogenik veya tümör süpresör etkileri tartışmalıdır. Hepatosellüler karsinomada ve osteokarsinomada miR-9 ekspresyon artışının hücre çoğalması ve tümör metastazı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Farazi ve ark. 2011). Ancak çok sayıda çalışma miR-9'un yüksek oranda tümör süpresör etkili bir miRNA olduğunu ve hücre çoğalması, anjiyogenez ve migrasyon ile ilişkili genleri baskıladığını öne sürmüştür. Kolon kanseri, nazofarengal karsinoma, melanoma ve meme kanseri gibi birçok kanserde miR-9 ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (Li ve ark. 2009; Gao ve ark. 2013; Liu ve ark. 2012). Oral ve orofarengeal SHK'larda miR-9 geninin metilasyonunun arttığı saptanmış ve miR-9'un tümör gelişimi ve metastazında baskılayıcı rolü olduğu bildirilmiştir (Minor ve ark. 2012). Kahafei ve arkadaşları (2019) tarafından oluşturulan bir derlemede mir-9'un akciğer, meme, böbrek, mide, prostat serviks kanserleri ile glioma ve melanomalardaki anormal ekspresyonu, metilasyonu ve olası fonksiyonları ele alınmıştır. Bazı kanserlerde miR-9 FOXO1, NF- κ b gibi hücre çoğalmasını durduran genleri hedef alırken; bazı kanserlerde ise survivin, siklin D1, e-kadherin, β -katenin gibi apoptoz baskılayıcı, çoğalma ve invazyonu artırıcı genleri baskılamaktadır.

Çalışmamızda miR-9 ekspresyon seviyelerinin OSHK hastalarında sağlıklı kontrollere göre azalmış olduğu saptandı ($p=0,010$). Sigara içen ve sigara içmeyen sağlıklı kontroller arasında miR-9 ekspresyon farklılığı görülmedi.

miR-9 ekspresyonunun OSHK tümör hücrelerinde azaldığı ve miR-9 ekspresyon artışının OSHK hücrelerinde bir PI3K sinyal yolağı aktivatörü olan GSK-3 β 'yi inhibe ederek, hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Xiao ve ark. 2014). Benzer bir

başka çalışmada ise miR-9'un CDK4/6'yı hedef alarak OSHK kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Shang ve ark. 2018). Yu ve arkadaşları (2014) miR-9'un Wnt sinyal yolağı ile ilişkili olduğunu ve bu yolağın aşağı yönündeki (downstream) genlerin regülasyonunda rol oynadığını, miR-9'un Wnt sinyal yolağının bir aktivatörü olan CXCR4'ü baskıladığı ve miR-9 inhibisyonunun CXCR4 ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir. miR-9'un OSHK tümör gelişimini Wnt sinyal yolağı üzerinden baskıladığı öne sürülmüştür (Yu ve ark. 2014). Bu sonuçlarla zıtlık gösteren bir çalışmada ise miR-9'un HPV pozitif OSHK'da belirgin ölçüde yüksek ekprese olduğu bildirilmiş ancak HPV negatif OSHK hücrelerinde miR-9 ekspresyonu saptanmamıştır (Božinović ve ark. 2019) Benzer şekilde HPV pozitif serviks kanserinde de miR-9 ekspresyonunun yüksek olduğu ve HPV-E6 proteininin miR-9'u aktive ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2014). HPV pozitif tümörlerde miR-9 ekspresyonu yüksek saptanırken, HPV negatif tümörlerde miR-9 ekspresyon seviyesi genellikle azalmıştır. Çalışmamıza dahil edilen OSHK hastalarının %90'ının patoloji materyelinde HPV enfeksiyonunun negatifti. Sonuçlarımız miR-9'un OSHK'da tümör süpresör etkisinin olduğu görüşüne uyumludur.

Çalışmamızda lenf nodu metastazı olan OSHK hastalarında olmayanlara göre daha düşük oranda miR-9 ekspresyon seviyesi gözlendi ($p=0,04$). Nazofarengeal karsinomada azalmış miR-9 seviyeleri derin lenfatik invazyon ve metastaz ile ilişkili bulunmuştur (Lu ve ark. 2014) ancak bazı çalışmalarda yüksek miR-9 ekspresyonun kanser hücrelerinin metastazını arttırdığı belirtilmektedir (Ma ve ark. 2010). OSHK hastalarının serum örneklerinden yapılan bir çalışmada Sun ve arkadaşları (2016) azalmış miR-9 seviyelerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. OSHK'da tükürük örneklerinden miR-9 ekspresyonuna bakılmış çalışmalar çok azdır. Baş-boyun kanserlerinde tükürükteki miRNA ekspresyonlarına dair yapılan bir çalışmada; orofarinks ve hipofarinks kanserlerinde miR-9 ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (Salazar ve ark. 2014). OSHK'da patogenezinde miR-9 ekspresyonunun etkisinin olduğu söylenebilir ancak bir biyobelirteç olarak nitelendirilebilmesi için daha yüksek hasta sayılarını kapsayan ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Çalışmamızda FA hastalarında miR-9 ekspresyonunun tüm gruplara göre daha azalmış olduğu görüldü. FA hastalarındaki miR-9 ekspresyon seviyelerindeki azalmanın

sağlıklı kontrollere göre anlamlı olduğu belirlendi ($p=0,017$). Ancak OSHK ve FA hastaları arasında miR-9 ekspresyonu açısından bir korelasyon saptanmadı ($p=0,71$). Kanseri geliştiren 3 FA hastamızda diğer FA hastalarına göre miR-9 seviyeleri bakımından belirgin bir farklılık yoktu ve ağız yaraları olan FA hastaları ile olmayanlar arasında da anlamlı bir fark gözlenmedi. Literatürde FA hastalarında miR-9 ekspresyonu ile ilişkili çalışma bulunmamaktadır. FA hastalarında OSHK hastalarına benzer miR-9 ekspresyonu görüldüğü için bu hastaların ağız içi lezyonları açısından yakın takibi gerekmektedir.

miR-34a kanser gelişiminde etkisi iyi bilinen bir miRNA'dır ve hedefleri arasında çok sayıda Wnt ve PI3K sinyal yollarıyla bağlantılı gen bulunmaktadır (Hermeking 2010). miR-34a'nın baskıladığı genler (WNT1, CTNNB1, AXIN2, PIK3CA, PTEN, MAP2K, AKT, CDKN1A vb.); kanser hücrelerinin çoğalması, sağkalımı ve ilaç direnci gibi süreçlerde rol oynar. miR-34a ekspresyonundaki düzensizlikler birçok kanserle ilişkilendirilmiştir ve kanser hücrelerinde miR-34a ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir (Liang ve ark., 2007; Gaur ve ark. 2007; Corney ve ark. 2010; Tivnan ve ark. 2011). miR-34a aynı zamanda apoptozda da görev alan bir miRNA'dır (Raver-Shapriha ve ark. 2007; Hermeking 2010).

miR-34a etkili bir tümör süpresördür. Lösemi, lenfoma, over kanseri ve gliomalarda azalmış miR-34a ekspresyonu rapor edilmiştir (Slabáková ve ark. 2017). Baş-boyun skuamöz hücreleri karsinomlarında miR-34a'nın tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Kumar ve ark. 2012). miR-34a özellikle baş- boyun SHK'lar için değerli bir biyobelirteç adayı olarak düşünülmektedir (Li ve ark. 2018).

Çalışmamızda miR-34a ekspresyonunun OSHK hastalarında sağlıklı kontrollere göre azaldığı belirlendi ($p=0,012$). Sigara içen ve içmeyen sağlıklı kontrollerin miR-34a seviyeleri arasında ise anlamlı fark bulunmadı. Bir çalışmada OSHK tümör dokularında miR-34a'nın ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir (Coutinho ve ark. 2017). miR-34a ekspresyonunun lenf nodu metastazı görülen hastaların dil tutulumu gösteren OSHK tümör dokularında, görülmeyenlere göre daha düşük olduğu, yüksek miR-34a ekspresyonunun tümör invazyon ve metastazını baskıladığı gösterilmiştir (Jia ve ark. 2014). Ge ve ark. (2019) OSHK tümör dokuları ve hücre hatlarında miR-34a ekspresyonunun azaldığını ve miR-34a'nın tümör proliferasyonu, invazyon ve metastazını inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada OSHK'da miR-34a

ekspresyonundaki azalmanın indirekt olarak p53'ü inhibe ettiği ve tümör gelişimine katkı sağladığı belirlenmiştir (Manikandan ve ark. 2015).

Bu çalışmalara karşıt olarak; pankreatik duktal karsinomlu hastaların serum örneklerinde miR-34a ekspresyonunun arttığı ancak tükürük örneklerinde kontrollere göre miR-34a seviyelerinde fark bulunmadığı rapor edilmiş, miR-34a'nın diagnostik bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (Alema ve ark. 2016). Ancak Rawi ve ark. (2021) OSHK'da tükürükte bulunan miRNA'ları kapsayan sistematik bir çalışmada miR-34a'nın ekspresyonunun azaldığı bildirmiştir. Bizim sonuçlarımız bu araştırma ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda muhtemelen hasta sayısının sınırlı olması nedeniyle OSHK hastalarının klinik verileri ile miR-34a ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık yakalanmasa da, miR-34a ekspresyonu tümör tümör evresi yüksek olanlarda ve lenf nodu metastazı olan hastalarda, olmayanlara göre daha düşük gözlemlendi. Birçok literatür ile paralel olan bu verilerin daha yüksek hasta sayılarında istatistiksel olarak da anlamlı olacağı muhtemeldir.

FA hastalarında miR-34a ekspresyon seviyesi sağlıklı kontrollere göre düşük bulundu ($p=0.014$) ve OSHK hastaları ile aralarında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.078$). FA hücrelerinde p53 aktivasyonu yüksektir, bu nedenle miR-34a gibi apoptoz uyarıcılarda artış görülmesi daha muhtemeldir. Tümörögenез sırasında da bu moleküllerin seviyelerinin düşmesi beklenir. FA hastalarının tükürük örneklerinde miR-34a seviyesindeki azalma; FA hücrelerinin apoptoza yatkın olmaları nedeniyle farklı moleküler mekanizmalar üzerinden apoptoza baskılama yönünde bir eğilim göstermeleri olarak yorumlanabilir. FA hastalarında miR-34a ekspresyonuna ilişkin tek literatür akut GvHD (graft versus host disease) geçiren hastalarda artan apoptoza bağlı olarak p53 ve miR-34a seviyelerinin yükselebileceği üzerinedir (Wang ve ark. 2013).

miR-34a'nın dikkati çeken hedef genlerinden biri BIRC5'tir ve bu gen apoptoz inhibitörü survivini kodlar. miR-34a'nın ekspresyonundaki düzensizlikler survivin üzerinde etkili olur. Survivin aktivasyonu apoptoza baskılar, hücre çoğalmasını artırır ve kanser gelişimine katkı sağlar. Laringeal SHK dokularında azalmış miR-34a ekspresyonu ile negatif korelasyon gösteren yüksek survivin ekspresyonu saptanmış ve miR-34a'nın survivini hedef alarak hücre çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir (Shen ve ark. 2012) Benzer şekilde mide kanserlerinde de miR-34a'nın artan ekspresyonunun

kanser hücrelerinin apoptozunu arttırdığı, ve miR-34a'nın survivin protein ekspresyonunu baskıladığı ve mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir (Cao ve ark. 2012).

Çalışmamızda survivin düzeyleri ve miR-34a ekspresyon seviyeleri birlikte değerlendirildiğinde; miR-34a ekspresyon seviyesindeki azalmanın, survivin serum düzeyindeki artış ile korelasyon gösterdiği belirlendi. Tükürükteki miR-34a ekspresyonunun dolaşımdaki miRNA'ların bir temsili olduğu düşünüldüğünde elde ettiğimiz bu sonuç literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Birçok kanserde survivinin yüksek ekspresyonu rapor edilmiştir. Survivin bir hücre döngüsü proteinidir ve hem hücre döngüsü kontrolünde hem de apoptozun baskılanmasında rol oynar (Pickhard ve ark. 2014). Survivin ekspresyonu Akt üzerinden PI3K sinyal yolağı aracılığı ile gerçekleşir (Zhao ve ark. 2010). Akciğer, mide, kolon kanserlerinde ve OSHK'da survivin ekspresyonu artmıştır (Palazzo ve ark. 2015; Liu ve ark. 2016). Tümör dokularında yüksek survivin ekspresyonu daha agresif tümör paternine yol açtığı belirlenmiştir. Baş-boyun kanserlerinde survivinin PI3K yolağı ile ilişkili potansiyel bir prognostik belirteç olabileceği öne sürülmüştür (Pickhard ve ark. 2014).

Birçok farklı kanser çalışmasında survivin ekspresyonunun çeşitli vücut sıvılarında arttığı saptanmıştır. Böbrek kanserli hastaların idrar örneklerinde yüksek survivin ekspresyonu bulunmuştur (Srivastava ve ark. 2013). Kapellos ve ark. (2013) akciğer kanserli hastaların doku ve kan örneklerinde, Park ve ark. (2012) ise plevra sıvısında survivin ekspresyonunun yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Survivin kanser tanısı ve tedavisi için umut veren bir hedef moleküldür ancak OSHK hastalarının vücut sıvılarında survivin ekspresyonuna dair az sayıda çalışma vardır. Bir çalışmada OSHK hastalarının hem serum hem de tükürük örneklerinde kontrol grubuna göre survivin ekspresyonlarının artmış olduğu gösterilmiştir (Li ve ark. 2016). Bir başka çalışmada ise serum survivin seviyeleri over, kolon ve meme kanserlerinde sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur (Günaldı ve ark. 2018). Çalışmamızda bu araştırmalara paralel şekilde OSHK hastalarının serum survivin düzeylerinin tüm sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,04$). OSHK hastaları ile sigara içmeyen sağlıklı kontroller arasındaki survivin düzeyi farkı yüksek iken ($p=0,01$), sigara içmeyen kontroller ile OSHK hastalarının survivin düzeyleri farkı anlamlı bulunmadı ($p=0,25$).

Serum survivin düzeyleri sigara içen kontrollerde içmeyenlere göre anlamlı ölçüde daha yüksekti ($p=0,03$).

Nikotin ve butanon gibi sigara bileşenlerinin normal insan bronş epitel hücrelerinde survivin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiş ve bu durumun hücrelerin malignant dönüşümünde rol oynadığı öne sürülmüştür (Jin ve ark. 2008). Lima ve ark. (2015) sigara tüketiminin oral mukozada survivin ekspresyon değişikliklerine yol açtığını bildirmişlerdir. Hirano ve ark. (2015) akciğer kanserlerinde sigara kullanımının erken evredeki hastalarda daha yüksek survivin ekspresyonuna katkı sağladığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda sigara kullanan sağlıklı kontrollerde sigara içmeyen sağlıklı kontrollere göre daha yüksek survivin düzeyleri sergilemesi bu sonuçlara göre yorumlanabilir.

Çalışmamızda FA hastalarında survivin serum düzeyleri hem OSHK hastalarına göre ($p=0,028$), hem de sağlıklı kontrollere göre ($p=0,001$) çok yüksek bulundu. Bu sonuçlara göre serum survivin düzeyleri FA hastalarında OSHK gelişimi için uygun bir belirteç değildir. Çalışmamız ile doğrudan ilişkili olmasa da Al-Rahawan ve ark. (2008) %25'i FA'li hastalar olan bir aplastik anemili hasta grubunun kemik iliği biyopsilerinde özellikle kalıtsal AA'li hastalarda yüksek oranda artmış survivin ekspresyonu saptamışlardır. Bu çalışmada; kalıtsal AA'li hastaların hücrelerindeki DNA tamir defektleri sonucunda aşırı uyarılan p53 nedeniyle artan apoptozdan kaçış mekanizması olabileceği öne sürülmüştür.

OSHK hastaları ve sağlıklı kontrol grupları arasında yapılan survivin ROC eğrisi analizinde AUC 0,710 olarak saptandı ancak duyarlılık oranı %24 olarak bulundu. Bir çalışmada over, kolon ve meme kanserlerinde serum survivin analizinde AUC değeri 0,665, duyarlılık %59.70 ve özgüllük %73.91 olarak belirlenmiştir (Günaldı ve ark. 2018). Wu ve ark. (2009) plevra efüzyon örneklerinde survivin ekspresyonunun malignite tespiti için %79 ve %93 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu göstermiştir.

miR-196a birçok tümör süpresör genin negatif regülatörüdür ve FOXO1, p27, I κ Ba, netrin4, mTOR ve PI3K gibi birçok genin ekspresyonunu düzenleyerek hücre proliferasyonunu teşvik eder (Song ve ark. 2020). miR-196a'nın küçük hücreli dışı akciğer kanseri, mide kanseri ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinin çoğalma ve invazyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Liu ve ark. 2012; Tsai ve

ark. 2014; Zhang ve ark. 2014). miR-196a'nın OSHK hücrelerinde FOXO1'i hedef olarak hücre çoğalması, apoptoz ve metastaz üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Song ve ark. 2020). Bu çalışmada OSHK hücre hatlarında miR-196a ekspresyon seviyesindeki azalmanın; hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre apoptozunu indüklediği ve hücre göçünü azalttığı gösterilmiştir. Song ve ark. (2020) miR-196a'nın PI3K yolağını aktive ettiğini belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada OSHK tümör dokusu örneklerinde miR-196a'nın yüksek ekspresyonu bildirilmiş ve bunun tümör nüksü, nodal metastaz ve mortalite ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Liu ve ark. 2013).

miR-196a'nın OSHK için bir prognostik belirteç olabileceği belirtilmektedir (Tsai ve ark. 2017; Maruyama ve ark. 2018). Çalışmamızda OSHK hastalarında kontrol gruplarına göre miR-196 seviyelerinde fark saptanmadı. Çalışmaya dahil edilen hastaların %70'i erken evrede (T1 ve T2) idi. OSHK hastalarının miR-196a seviyelerinde fark görülmemesinin nedeninin ileri evrelerdeki (T3 ve T4) hastaların daha az sayıda olmasından kaynaklı olabileceği düşünülebilir.

Bazı çalışmalar kanserlerde dolaşımdaki miRNA'ların büyük oranda tümör hücrelerinden kaynaklandığını öne sürseler de (Mitchell ve ark. 2008), miRNA ekspresyonlarında görülen artış ya da azalışın altında yatan mekanizmalar tam bilinmemektedir. Wulfken ve ark. (2011) tarafından yapılan kapsamlı bir çalışmada renal hücreli karsinoma hastalarının doku ve serumlarındaki miRNA ekspresyonları karşılaştırıldı ve serumda 133 miRNA yüksek eksprese bulunurken, tümör dokularında sadece 36 miRNA yüksek saptandı. Kanserli hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada ise hücreler ve hücre dışı alan arasındaki miRNA seviyelerindeki farkın, miRNA'ların seçici bir salınımı ile açıklanabileceği belirtilmiştir (Pigati ve ark. 2012). Dolayısı ile farklı kanserlerin gelişiminde farklı mekanizmaların miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynaması muhtemeldir. Mazumder ve ark. (2019) tarafından yapılan bir derlemede aynı miRNA'ların serum ve tükürükteki ekspresyon seviyelerinde farklılıklar olabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda serum düzeyi değerlendirilen bir diğer protein CIP2A'dır. CIP2A kanser hücrelerinin çoğalmasını, büyümesini ve apoptoza karşı direncini teşvik eden bir onkoproteindir. CIP2A, kanser hücrelerinde Akt fosforilasyonunu baskılayan ve c-Myc'yi stabilize eden protein PP2A'yı inaktive eder. PP2A hem PI3K hem de Wnt sinyal yolları üzerinde inhibitör etkiye sahiptir. İnsan malinitelerinin çoğunda

anormal CIP2A ekspresyonları bildirilmiştir (Soofiyanı ve ark. 2017). CIP2A'nın özafagus SHK'larında ve adenokarsinomlarında tümör hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir (Qu ve ark. 2012; Rantanen ve ark. 2013). Meme, mide, pankreas, serviks, böbrek ve kolon kanserlerinde de tümör dokularında yüksek CIP2A ekspresyonu saptanmıştır (Côme ve ark. 2009; Theng ve ark. 2012; Zhao ve ark. 2014; Farrell ve ark. 2014; Soofiyanı ve ark. 2017).

Meme, böbrek ve kolorektal kanserli hastaların serum örneklerinde doku çalışmalarına paralel olarak yüksek CIP2A seviyeleri saptanmıştır (Xing ve ark. 2016; Chen ve ark. 2020; Chen ve ark. 2021). Kolorektal kanserler ve meme kanseri için CIP2A'nın yaralı bir prognostik belirteç ve teröpatik hedef olduğu öne sürülmüştür (Xing ve ark. 2016; Chen ve ark. 2021).

Çalışmamızda OSHK hastalarında serum CIP2A seviyeleri sağlıklı kontrollere göre belirgin ölçüde yüksek bulundu ($p<0,001$). Sigara içen ve sigara içmeyen kontroller arasında CIP2A düzeyinde farklılık saptanmadı. OSHK hastalarının klinik verileri ile CIP2A ekspresyonu arasında korelasyon bulunmadı. FA hastalarının hem OSHK hastaları hem de sağlıklı kontroller arasında serum CIP2A düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0,05$).

OSHK'da CIP2A ile ilişkili az sayıda çalışma vardır. Velmurugan ve ark. (2019) OSHK tümör dokularında yüksek CIP2A ekspresyonu olduğunu göstermişler ve CIP2A ekspresyonunu zayıf tümör diferansiyasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise CIP2A'nın OSHK hücre hatları ile displazik ve malign insan oral epitel dokularında normal kontrollere göre yüksek oranda eksprese edildiği ortaya konmuştur (Katz ve ark. 2010). Literatürde OSHK hastalarının serum örneklerinde CIP2A düzeylerine dair çalışma bulunmamaktadır ancak bulgularımız OSHK doku örneklerinde yapılan çalışmalar ve diğer kanserlerde serum örneklerinde yapılan çalışmaları ile uyumludur. Basile ve Czerninski (2015) yazdıkları kısa bir derlemede CIP2A'nın PI3K ve Erk yollarını aktive ederek oral kanser gelişiminde rol oynadığını belirtmişlerdir. Buna göre OSHK'da CIP2A yüksek ekspresyonu beklenen bir sonuçtur.

OSHK hastaları ve sağlıklı kontroller ile yapılan CIP2A ROC eğrisi analizinde AUC değeri 0,710 bulundu ve <56,21 cut off değeri için duyarlılık %80, özgüllük %92 olarak tespit edildi. Bu değerler CIP2A'nın OSHK açısından bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir ancak bu sonuçların daha yüksek hasta sayılarıyla yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Tez çalışmamızda son incelen protein olan β -katenin hücre büyümesi ve farklılaşması ile ilişkili Wnt sinyal yolunun anahtar regülatörüdür (Blankesteyn ve ark. 2000). Birçok kanserde Wnt sinyalinin hiperaktivasyonu görülmektedir. Wnt sinyali hiperaktif olduğunda β -katenin nükleusta birikir ve hedef genlerin aşırı uyarımına neden olur (Bankfalvi ve ark. 2002). β -katenin'in aşırı aktivitesi OSHK'nın ilerlemesine katkıda bulunur; OSHK'da β -katenin hedef genlerinden siklin D1, survivin ve c-myc yüksek oranda görülür (Reyese ve ark. 2020). Birçok kanserde β -kateninin anormal ekspresyonları gözlenmiş ve β -kateninin kanserlerde potansiyel prognostik belirteç olabileceği düşünülmüştür (Jawhari ve ark. 1997; Aaltomaa ve ark. 1999). Normal epitel dokularında β -katenin yoğun olarak hücre membranında bulunur, sitoplazmadaki β -katenin ise hızlı bir şekilde yıkıma uğrar. Kanser gelişiminin başlangıcında β -katenin hücre membranında azalır veya bazen hiç görülmez. Bu durum oral kanserler, özofagus kanserleri, kolon kanserleri gibi kanserlerde siktir (Bailey ve ark. 1998; González-Moles ve ark. 2014). β -kateninin ağız kanseri dokularında genellikle yüksek oranda eksprese edildiği ve nükleusta yoğun β -katenin birikiminin proliferasyon, invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mohamed ve ark. 2007; Zhong ve ark. 2007). OSHK'da genellikle β -kateninin hücre membranındaki ekspresyonunda azalma görülür ve bu durum hücre hareketini ve çoğalmasını artırır; β -kateninin membrandaki azalması tümör evresi, histolojik farklılaşma ve lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (Cai ve ark. 2008; Chaw ve ark. 2012; Zaid ve ark. 2014).

Çalışmamızda OSHK hastalarında serum β -katenin düzeyi sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p=0,034$). Sigara içen ve sigara içmeyen sağlıklı kontroller arasında serum β -katenin düzeyi açısından fark görülmedi.

Kanserlerde serum β -katenin düzeylerine ilişkin çalışmalar azdır, OSHK'da ise bu konuda yapılmış çalışma yoktur. Bir çalışmada kolorektal kanserlerde sağlıklı kontrollere göre serumda yüksek β -katenin düzeyi saptanmıştır (Li ve ark. 2019). Bu çalışmada tümör dokularında da immünohistokimyasal olarak yoğun β -katenin belirlenmiştir. Yüksek serum β -katenin düzeyleri HBV-ilişkili HCC ile ilişkili bulunmuştur (Zekri ve ark. 2011) Yadav ve ark. (2020) akut myeloid lösemi hastalarının serumlarında kontrollere göre β -katenin düzeyinin yüksek olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda OSHK hastalarının serumlarında düşük bulunan β -

katenin düzeylerinin, kanser hücre membranlarındaki azalmaya benzer bir mekanizma üzerinden dolaşımdaki β -katenin düzeyini de etkileyebileceği düşünülebilir. OSHK hastalarının tümör doku örnekleri ve serum örnekleri β -katenin açısından birlikte değerlendirildiği takdirde daha anlamlı bir sonuç ortaya çıkabilecektir.

Çalışmamızda serum β -katenin düzeyleri FA hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde yüksek bulundu. ($p=0,008$). FA proteinlerinin β -katenin ile doğrudan etkileşim kurdukları ve Wnt sinyalinin inhibitörü olan DKK1'i regüle ettikleri gösterilmiş ve bu çalışmaya göre FA defekti söz konusu olduğunda β -kateninin nükleusa geçişi engellenmektedir (Huard ve ark. 2014). Dao ve ark. (2012) FANCL gen mutasyonlarının β -katenin yıkımını arttırarak Wnt sinyalinin inaktivasyonunda rol oynadığını göstermişlerdir. FA hastalarındaki FANCL mutasyonlarının β -katenin üzerinde etkili olması olasıdır. Çalışmamız moleküler düzeyde bir veri sunmasa da FA hastalarında mevcut bir β -katenin regülasyon bozukluğuna işaret etmektedir. FA hastalarında β -katenin ve dolayısı ile Wnt sinyal yolağında meydana gelen düzensizliklerin farklı bir veya birkaç sinyal yolağının da regülasyonunu bozarak kanser gelişimine katkı sağladığı hipotezi düşünülebilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda miR-9 ve miR-34a miRNA'larının OSHK hastalarında anlamlı ölçüde azaldığı saptandı ve bu sonuçların literatür ile genel olarak uyumluluk gösterdiği belirlendi. miR-9 ve miR-34a OSHK gelişimi açısından değerlendirilebilecek biyobelirteç adaylarıdır. Çalışmamızda OSHK hastalarında survivin ve CIP2A serum düzeyleri yüksek olarak belirlendi, CIP2A'nın OSHK hastalarını saptamak için uygun bir biyobelirteç olabilir ve CIP2A FA hastalarında da OSHK takibi için kullanılabilir. Benzer şekilde sigara tüketimi de survivin serum düzeylerini arttırmakta olup, OSHK tespitinde kullanılabilir .

Hasta sayıları arttırılarak çok merkezli sistematik çalışmaların yapılmasının sonuçlarımızı destekleyeceğini düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra farklılık saptanan biyobelirteçlerin moleküler düzeydeki etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için tümör dokuları ve/veya hücre hatları ile ek çalışmalar yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- A.K. Srivastava, P.K. Singh, K. Srivastava, D. Singh, D. Dalela, S.K. Rath ve ark. (2013) Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14, 81-85.
- A.S. Farrell, B. Allen-Petersen, C.J. Daniel, X. Wang, Z. Wang, S. Rodriguez, S. Impey, J. Oddo, M.P. Vitek, C. Lopez (2014). Targeting inhibitors of the tumor suppressor PP2A for the treatment of pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* 12, 924–939.
- Aaltomaa, S., P. Lipponen, M. Ala-Opas, M. Eskelinen, and V.M. Kosma. (1999) α -Catenin expression has prognostic value in local and locally advanced prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 80:477–482.
- Al Rawi N, Elmabrouk N, Abu Kou R, Mkadmi S, Rizvi Z, Hamdoon Z. (2021) The role of differentially expressed salivary microRNA in oral squamous cell carcinoma. A systematic review. *Arch Oral Biol.* May; 125:105108.
- Aleamar B, Izetti P, Gregório C, Macedo GS, Castro MA, Osvaldt AB, Matte U, Ashton-Prolla P. (2016) miRNA-21 and miRNA-34a Are Potential Minimally Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. Jan;45(1):84-92.
- Al-Rahawan MM, Alter BP, Bryant BJ, Elghetany MT. (2008) Bone marrow cell cycle markers in inherited bone marrow failure syndromes. *Leuk Res.* Dec;32(12):1793-9.
- Altınok B. ve Sunguroğlu A. (2016) WNT Sinyal Yolağı ve Kanser. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*; 15(2).
- Bagby G.C., Alter B.P. Fanconi anemia. *Semin Hematol.* (2006) Jul;43(3):147-56.
- Bailey Jerjes W., Upile T., Petrie A. ve ark. (2010) Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2(1):9.
- Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J. (1998) Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus–dysplasia– adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *Am J Pathol*; 152:135–44.
- Balasundaram P., Singh M.K., Dinda A.K., Thakar A., Yadav R. (2014) Study of β -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. *Diagn Pathol.* Jul 21;9:145.

Bankfalvi, A., M. Kraßort, A. Végh, E. Felszeghy, and J. Piffkó. (2002) Deranged expression of the E-cadherin/ β -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J. oral Pathol. Med.* Wiley Online Library, 31:450–457.

Bhandari J, Thada PK, Puckett Y. Fanconi Anemia. (2021) In: StatPearls [Internet]. *Treasure Island (FL)*: StatPearls Publishing; Jan.

Blankesteyn, W.M., M.E. van Gijn, Y.P.G. Essers-Janssen, M.J.A.P. Daemen, and J.F.M. Smits. (2000) β -catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction. *Am. J. Pathol.* Elsevier, 157:877–883,

Božinović K., Sabol I., Dediol E., Milutin Gašperov N., Manojlović S., Vojtechova Z., Tachezy R., Grce M. (2019) Genome-wide miRNA profiling reinforces the importance of miR-9 in human papillomavirus associated oral and oropharyngeal head and neck cancer. *Sci Rep.* Feb 19;9(1):2306.

Cai Malik. U. U., Zarina S., Pennington S. R. (2016) Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Archives of Oral Biology*, Mar;63:53-65.

Cao, Min, ve ark. (2018) MicroRNAs as effective surrogate biomarkers for early diagnosis of oral cancer. *Clinical oral investigations* 22.2: 571-581.

Centelles PV, Seoane-Romero JM, Gómez I, Diz-Dios P, de Melo NS, Seoane J. (2012) Timing of oral cancer diagnosis: Implications for prognosis and survival. In: Ogbureke KUE, editor. *Oral Cancer*. pp. 173–188.

Chaw Cao W, Fan R, Wang L, Cheng S, Li H, Jiang J, Geng M, Jin Y, Wu Y. (2013) Expression and regulatory function of miRNA-34a in targeting survivin in gastric cancer cells. *Tumour Biol.* Apr;34(2):963-71.

Chaw S., Majeed A.A., Dalley A., Chan A., Stein S., Farah C.S. (2012) Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers–E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin–in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol.* ;48:997–1006.

Che R., Zhang J., Nepal M., Han B., Fei P. (2018) Multifaceted Fanconi Anemia Signaling. *Trends Genet.* Mar;34(3):171-183.

- Chen W., Liang J.L, Zhou K., Zeng Q.L., Ye J.W., Huang M.J. (2020) Effect of CIP2A and its mechanism of action in the malignant biological behavior of colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. Apr 22;18(1):67. doi: 10.1186/s12964-020-00545-6.
- Choi S., Myers J.N. (2008) Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res*; 87: 14-32.
- Côme C., Laine A., Chanrion M., Edgren H., Mattila E. Ve ark. (2009) CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin. Cancer Res*. 15 5092–5100.
- Corney D.C. ve ark. (2010) Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin Cancer Res*.;16:1119–28.
- Coutinho-Camillo C.M., Lourenço S.V., de Araújo Lima L., Kowalski L.P., Soares F.A. (2015) Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet*. Jul-Aug;208(7-8):382-9.
- D.S. Park, K.E. Hwang, H. Shim, B.R. Kim, K.H. Choi, S.H. Park ve ark. (2012) Elevated survivin is associated with a poor response to chemotherapy and reduced survival in lung cancer with malignant pleural effusions. *Clin Exp Metastasis* 29, 83-89.
- Dao, K.-H.T. ve ark. (2011) FANCL Ubiquitinates Beta-Catenin and Enhances Its Nuclear Function. *American Society of Hematology*, 248:833.
- Degan P., Cappelli E., Longobardi M., Pulliero A., ve ark. (2019) A Global MicroRNA Profile in Fanconi Anemia: A Pilot Study. *Metab Syndr Relat Disord*. Feb;17(1):53-59.
- DIANA Tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>)
- Düz M. B., Karataş Ö. F., Guzel E., Turgut N. F., Yilmaz M ve ark. (2016) Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell Oncol (Dordr)*.; 39(2):187-93.
- E. Palazzo, P. Morandi, R. Lotti, A. Saltari, F. Truzzi, S. Schnebert ve ark. (2015) Notch Cooperates with Survivin to Maintain Stemness and to Stimulate Proliferation in Human Keratinocytes during Ageing. *Int J Mol Sci* 16, 26291- 26302.
- Engelman JA, Luo J, Cantley LC. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 7:606-19.
- Farazi, T. A., Spitzer, J. I., Morozov, P., & Tuschl, T. (2011). miRNAs in human cancer. *The Journal of Pathology*, 223(2), 102–115.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*., 9:102–114.

- Fuentes B, Duaso J, Droguett D, et al. (2012) Progressive extracellular matrix disorganization in chemically induced murine oral squamous cell carcinoma. *ISRN Pathology*.
- Gamallo C., Palacios J., Moreno G., Calvo de Mora J., Suárez A., Armas A. (1999) Beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol*, 155:527-536
- Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P. (2008) Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*, 122:155–164.
- Gao F., Zhao Z., Zhao W., ve ark. (2013) miR-9 modulates the expression of interferon-regulated genes and MHC class I molecules in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 431:610–616.
- Gasparoni A., Chaves A., Fonzi L., Johnson G.K., Schneider G.B., Squier C.A. (2002) Subcellular localization of beta-catenin in malignant cell lines and squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. Aug;31(7):385-94.
- Gaur A. ve ark. (2007) Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 67:2456–68.
- Ge X., Gao J., Sun Q.W., Wang C.X., ve ark. (2020) MiR-34a inhibits the proliferation, migration, and invasion of oral squamous cell carcinoma by directly targeting SATB2. *J Cell Physiol*. May;235(5):4856-4864.
- Giancotti F.G. (2014) Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett*. 588(16):2558-2570.
- González-Moles M.A., Ruiz-Ávila I., Gil-Montoya J.A., Plaza-Campillo J., Scully C. (2014) β -catenin in oral cancer: an update on current knowledge. *Oral Oncol*. Sep;50(9):818-24.
- Gunaldi M, Isiksacan N, Kocoglu H, Okuturlar Y, Gunaldi O, Topcu TO, Karabulut M. (2018) The value of serum survivin level in early diagnosis of cancer. *J Cancer Res Ther*. Apr-Jun;14(3):570-573. doi: 10.4103/0973-1482.171369.
- Han B., Shen Y., Zhang P., Jayabal P., Che R., Zhang J. ve ark. (2017) Overlooked FANCD2 variant encodes a promising, portent tumor suppressor, and alternative polyadenylation contributes to its expression. *Oncotarget*. Apr 4; 8(14):22490-22500.
- Harvey A.J. (2019) Overview of cell signaling pathways in cancer. In: *Predictive Biomarkers in Oncology*. Springer;:167-182.

- Hema K. N., Smitha T., Sheethal S. H., Angeline Mirnalini S. (2017) Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.*, May-Aug; 21(2): 252–259.
- Hermeking H. (2010) The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.*;17:193–9.
- Hermeking H. (2010). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.*, 17, 193.
- Hirano H., Maeda H., Yamaguchi T., Yokota S., Mori M., Sakoda S. (2015) Survivin expression in lung cancer: Association with smoking, histological types and pathological stages. *Oncol Lett.* Sep;10(3):1456-1462.
- Huang Y., Shen X.J., Zou Q., Wang S.P, Tang S.M., Zhang G.Z. (2011) Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem.* Mar;67(1):129-39.
- Huard, C.C. ve ark. (2013) Fanconi anemia proteins interact with CtBP1 and modulate the expression of the Wnt antagonist Dickkopf-1. *Blood, J. Am. Soc. Hematol.* American Society of Hematology Washington, DC, 121:1729–1739.
- Iamaroon A., Pattanaporn K., Pongsiriwet S., Wanachantararak S., Prapayatatok S., Jittidecharaks S., Chitapanarux I., Lorvidhaya V. (2004) Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 583:9
- Indborg J.J., Reichart P.A., Smith C.J., Van der Waal I. (1997) WHO International Histological Classification of Tumours Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. *Springer-Verlag*; New York.
- Jia L.F., Wei S.B., Mitchelson K., Gao Y. Ve ark. (2014) miR-34a inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via targeting MMP9 and MMP14. *PLoS One.* Sep 30;9(9):e108435.
- Jin Q, Menter DG, Mao L, Hong WK, Lee HY (2008) Survivin expression in normal human bronchial epithelial cells: an early and critical step in tumorigenesis induced by tobacco exposure. *Carcinogenesis* 29:1614–1622
- Junttila MR, Puustinen P, Niemelä M ve ark. (2007). CIP2A inhibits PP2A in human malignancies". *Cell.* 130 (1): 51–62.
- Kapellos G., Polonifi K., Farmakis D., Spartalis E., Tomos P., Aessopos A., ve ark. (2013) Overexpression of survivin levels in circulation and tissue samples of lung cancer patients. *Anticancer Res* 33, 3475-3480.
- Karar J, Maity A. (2011) PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Front Mol*

Neurosci.;4:51.

Kato M. ve Kato M. (2017) Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *Int J Mol Med.* 40: 587-606,

Katz J., Jakymiw A., Ducksworth M.K., Stewart C.M., Bhattacharyya I. Ve ark. (2010) CIP2A expression and localization in oral carcinoma and dysplasia. *Cancer Biol Ther.* Oct 1;10(7):694-9.

Kehl T., Backes C., Kern F. ve ark. (2017) About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget.*;8(63):107167-107175.

Khafaei, M., Rezaie, E., Mohammadi, A., Shahnazi Gerdehsang, P., ve ark. (2019). miR-9: From function to therapeutic potential in cancer. *Journal of cellular physiology*, 234(9), 14651-14665.

Khan K.H., Yap T.A., Yan L., (2013) Cunningham D. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin J Cancer.*;32(5):253-265.

Khan KH, Yap TA, Yan L, Cunningham D. (2013) Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin J Cancer.*;32(5):253-265.

Kidacki M., Lehman H. L., Warrick J. I., Stairs D. B. (2015) Signaling Pathways Supporting Tumor Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Exp Pathol.*; 5:3.

Kinoshita T., Hanazawa T., Nohata N., Okamoto Y., Seki N. (2011) miRNA expression signatures of HNSCC *Journal of Human Genetics*, 1–11.

Kumar B, Yadav A, Lang J, Teknos TN, Kumar P. (2012) Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. *PLoS One.*;7(5):e37601.

Kurokawa H., Zhang M., Matsumoto S. Ve ark. (2005) The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 34:329–333.

Kurtz K.A., Hoffman H.T., Zimmerman M.B., Robinson R.A. (2006) Decreased E-cadherin but not beta-catenin expression is associated with vascular invasion and decreased survival in head and neck squamous carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg.* Jan;134(1):142-6.

Kutler D.I., Auerbach A.D., Satagopan J., Giampietro P.F. ve ark. (2012) High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 129: 106-112;

- L. Feller and J. Lemmer. (2012) Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment," *Journal of Cancer Therapy*, Vol. 3 No. 4, pp. 263-268.
- Lakshminarayana S., Augustine D., Rao R. S., Patil S., Awan H. K., Venkatesiah S. S., Haragannavar V. C., Nambiar S., Prasad K. (2018) Molecular pathways of oral cancer that predict prognosis and survival: A systematic review. *J Carcinog.*, 17:7.
- Li J., Liu K., Zhang T., Yang Z., Wang R., Chen G., Kang M. A (2018) comprehensive investigation using meta-analysis and bioinformatics on miR-34a-5p expression and its potential role in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res*. Aug 15;10(8):2246-2263.
- Li J., Huang H., Sun L. ve ark. (2009).MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*. 15:3998–4008.
- Li, S.ve ark. (2019) Serum Expression of β -Catenin Is a Potential Detection Marker in Patients with Colorectal Cancer. *Disease markers* vol. 5070524.
- Li, Shu-Xia ve ark. (2016) Detection of Survivin, Carcinoembryonic Antigen and ErbB2 Level in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. 377 – 382.
- Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*; 8: 166.
- Lien E. C., Dibble C. C., Toker A. (2017) PI3K Signaling in Cancer: Beyond AKT. *Curr Opin Cell Biol.*; 45: 62–71,.
- Lima C.F., Crastechini E., Issa J.S., Balducci I. Ve ark. (2015) Evaluation of apoptotic pathway in oral mucosa by smoking in a Brazilian Outpatient Smoking Cessation Program. *Int J Cardiol*. Apr 1;184: 514-516.
- Liu C.J., Tsai M.M., Tu H.F., Lui M.T., Cheng H.W., Lin S.C. (2013) miR-196a overexpression and miR-196a2 gene polymorphism are prognostic predictors of oral carcinomas. *Ann Surg Oncol*. Dec;20 Suppl 3:S406-14.
- Liu W, Palovcak A, Li F. ve ark. (2020) Fanconi anemia pathway as a prospective target for cancer intervention. *Cell Biosci* 10, 39.
- Liu W., Gao G., Hu X., Wang Y., Schwarz J.K., Chen J.J., Grigsby P.W., Wang X. (2014) Activation of miR-9 by human papillomavirus in cervical cancer. *Oncotarget*. Nov 30;5(22):11620-30.
- Liu X.H., Lu K.H. ve ark. (2012) MicroRNA-196a promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and invasion through targeting HOXA5. *BMC Cancer*;12(348).

- Liu S., Kumar S.M., Lu H. ve ark. (2012) MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- κ B1-Snail1 pathway in melanoma. *J Pathol.*, 226:61–72.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods*. Dec;25(4):402-8.
- Lu J., Xu X., Liu X., Peng Y., Zhang B., Wang L. ve ark. (2014) Predictive value of miR-9 as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Br J Cancer*. Jan 21;110(2):392-8.
- Luo D., Fu J. (2018) Identifying characteristic miRNAs-genes and risk pathways of multiple sclerosis based on bioinformatics analysis. *Oncotarget*. Jan 2;9(4):5287-5300.
- Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D. ve ark. (2010) miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. Mar;12(3):247-56.
- Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Down Regulation of miR-34a and miR-143 May Indirectly Inhibit p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma: a Pilot Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7619-25. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.17.7619. PMID: 26625772.).
- Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. (2015) Down Regulation of miR-34a and miR-143 May Indirectly Inhibit p53 in Oral Squamous Cell Carcinoma: a Pilot Study. *Asian Pac J Cancer Prev*.16(17):7619-25.
- Marron M., Boffetta P., Zhang Z.F. ve ark. (2010) Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. *Int J Epidemiol.*,39:182–196.
- Maruyama T., Nishihara K., Umikawa M. ve ark. (2018) MicroRNA-196a-5p is a potential prognostic marker of delayed lymph node metastasis in early-stage tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. Feb;15(2):2349-2363.
- Massano J., Regateiro F. S. ve ark. (2006) Oral Squamous Cell Carcinoma: Review of Prognostic and Predictive Factors. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, Vol. 102, No. 1, pp. 67-76.
- Mazumder S., Datta S., Ray J.G., Chaudhuri K., Chatterjee R. (2019) Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiol*. Feb;58:137-145.
- Meetei A.R., Levitus M., Xue Y. ve ark. (2004) X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet*. Nov;36(11):1219-24.

- Mehrotra R., Yadav S. ve ark. (2006) Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer*, 43: 60.
- Mesquita JA, Cavalvanti AL, Nonaka CFW, Godoy GP, Alves PM. (2014) Clinical and histopathological evidence of oral squamous cell carcinoma in young patients: systematized review. *J Bras Patol e Med Lab*. 50(1):67–74.
- Minor, J., Wang, X., Zhang, F., Song, J., Jimeno, A., Wang, X. J. ve ark. (2012). Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral oncology*, 48(1), 73-78.
- miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)
- Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. ve ark. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10513–10518.
- Nalepa G., Clapp D.W. (2018) Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship. *Nat Rev Cancer*. Mar;18(3):168-185.
- Nandagopal N., Roux P.P. (2015) Regulation of global and specific mRNA translation by the mTOR signaling pathway. *Translation*, 3(1):e983402
- Natarajan V. (2016) Regulation of DNA repair by non-coding miRNAs. *Noncoding RNA Res*. Nov 5;1(1):64-68.
- Nepal M., Che R., Zhang J., Ma C., Fei P. (2017) Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer*. 3(12):840-856.
- Neville BW, Day TA. (2002) Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 52:195–215.
- Olie R.A., Simões-Wüst A.P., Baumann B., Leech S.H., Fabbro D., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U. (2000). A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res*. 60 (11): 2805–9.
- Omura K. (2014) Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol*.
- Ota C., Baarsma H.A., Wagner D.E., Hilgendorff A., Königshoff M. (2016) Linking bronchopulmonary dysplasia to adult chronic lung diseases: role of WNT signaling. *Mol Cell Pediatr*. Dec;3(1):34.
- Panneerselvam J., Park H.K., Zhang J., Dudimah F.D., Zhang P., Wang H., Fei P. (2012) FAVL impairment of the Fanconi anemia pathway promotes the development of human bladder cancer. *Cell Cycle*. Aug 1; 11(15):2947-55.

- Panta P., Venna V.R. (2014) Salivary RNA signatures in oral cancer detection. *Anal Cell Pathol* (Amst), 2014:450629.
- Patel S.C., Carpenter W.R., Tyree S. ve ark. (2011) Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*; 29(11): 1488-94.
- Patel S.G., Shah J.P. (2005) TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin.*;55:242–258.
- Pedrero J. M., Carracedo D. G., Pinto C. M., Zapatero A. H., Rodrigo J. P., Nieto C. S., Gonzalez M. V. (2005) Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*.114:242–248.
- Pedrero, J. ve ark. (2005) Retracted: Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma." *International journal of cancer* 114.2: 242-248.
- Peng Y., Zhang X., Feng X., Fan X., Jin Z. (2017) The crosstalk between microRNAs and the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Oncotarget*. 8(8):14089-14106.
- Pickhard A., Gröber S., Haug A.K., Piontek G., Wirth M. ve ark. (2014) Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. Jun;117(6):733-42
- Pigati L., Yaddanapudi S.C., Iyengar R. ve ark. (2010) Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One* ;5:e13515.
- Qiu W., Schönleben F., Li X. ve ark. (2006). PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 12: 1441-6.
- Rantanen T., Kauttu T., Åkerla J. ve ark. (2013) CIP2A expression and prognostic role in patients with esophageal adenocarcinoma, *Med. Oncol*. 30: 684.
- Raver-Shapira N., Marciano E., Meiri E. ve ark. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53- mediated apoptosis. *Mol Cell*, 26, 731-43.
- Ravindran G., Sawant S.S., Hague A., Kingsley K., Devaraj H. (2015) Association of differential β -catenin expression with oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Head Neck*; 37:982–93.
- Reyes M., Flores T., Betancur D., Peña-Oyarzún D., Torres V.A. (2020) Wnt/ β -Catenin

Signaling in Oral Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.*, Jun 30;21(13):4682.

Reyes, Montserrat ve ark. (2020) Wnt/ β -Catenin Signaling in Oral Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 21.13: 4682.

Río P., Agirre X., Garate L., Baños R., Álvarez L. ve ark. (2012) Down-regulated expression of hsa-miR-181c in Fanconi anemia patients: implications in TNF α regulation and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. Mar 29;119(13):3042-9.

Rishabh K., Khadilkar S., Kumar A., Kalra I., Kumar A.P, Kunnumakkara A.B. (2021) MicroRNAs as Modulators of Oral Tumorigenesis-A Focused Review. *Int J Mol Sci.*, 22(5):2561.

Rivera C ve Venegas B. (2014) Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncology letters*. 8. 7-11.

Rivera C. (2015) Essentials of Oral Cancer. *Int J Clin Exp Pathol.*,8(9):11884-11894.

Sah N.K., Khan Z., Khan G.J., Bisen P.S. (2006). "Structural, functional and therapeutic biology of survivin". *Cancer Lett*. 244 (2): 164–71.

Salazar C, Nagadia R, Pandit P, Cooper-White J, Banerjee N, Dimitrova N, Coman WB, Punyadeera C. (2014) A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol (Dordr)*. Oct;37(5):331-8.

Salazar-Ruales C., Arguello J.V., López-Cortés A. ve ark. (2018) Salivary MicroRNAs for Early Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Case-Control Study in the High Altitude Mestizo Ecuadorian Population. *Biomed Res Int*. Nov 21:9792730.

Sannam Khan R., Khurshid Z., Akhbar S., Faraz Moin S. (2016) Advances of Salivary Proteomics in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Detection: An Update. *Proteomes*, 15;4(4).

Schneider SQ, Finnerty JR, Martindale MQ. Protein evolution: structure-function relationships of the oncogene beta-catenin in the evolution of multicellular animals. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2003 Feb 15;295(1):25-44. doi: 10.1002/jez.b.6. PMID: 12548541.

Shang A., Lu W.Y., Yang M., Zhou C. ve ark. (2017) miR-9 induces cell arrest and apoptosis of oral squamous cell carcinoma via CDK 4/6 pathway. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. Dec;46(8):1754-1762.

- Shang, Anquan ve ark. (2018) miR-9 induces cell arrest and apoptosis of oral squamous cell carcinoma via CDK 4/6 pathway. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 46.8 1754-1762.
- Shen Y., Lee Y.H., Panneerselvam J., Zhang J., Loo L.W, Fei P. (2015) Mutated Fanconi anemia pathway in non-Fanconi anemia cancers. *Oncotarget*. Aug 21; 6(24):20396-403.
- Shen Z., Zhan G., Ye D., Ren Y., Cheng L., Wu Z., Guo J. (2012) MicroRNA-34a affects the occurrence of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the antiapoptotic gene survivin. *Med Oncol*. Dec;29(4):2473-80.
- Singh, T. ve Kavin A. (2017) Fanconi anaemia and oral squamous cell carcinoma: management considerations. *NZ Med J* ,130 92-95.
- Slabáková, E., Culig, Z., Remšík, J. ve ark. (2017) Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis* 8, e3100.
- Slaughter D.P., Southwick H.W., Smejkal W. (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implication of multicentric origin. *Cancer*, 6: 963-8.
- Smeters S.E., Velleuer E., Dietrich R., ve ark. (2015) Noninvasive molecular screening for oral precancer in Fanconi anemia patients. *Cancer Prev Res (Phila)*., Nov;8(11):1102-11.
- Song H., Lai L., Liu M., Wang X., Zhang J., Zhang S. (2020). Investigating the role and mechanism of microRNA-196a in oral squamous cell carcinoma by targeting FOXO1. *Exp Ther Med*. Jun;19(6):3707-3715.
- Soofiyan S.R., Hejazi M.S., Baradaran B. (2017) The role of CIP2A in cancer: A review and update. *Biomed Pharmacother*. Dec; 96:626-633.
- Starzyńska A., Sejda A., Adamska P. ve ark. (2020) Prognostic value of the PIK3CA, AKT, and PTEN mutations in oral squamous cell carcinoma: literature review. *Archives of Medical Science*. 2021;17(1):207-217.
- Steelman L.S., Franklin R.A., Abrams S.L ve ark. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia*. 2011;25(7):1080-1094.
- Sun L., Liu L., Fu H., Wang Q., Shi Y. (2016) Association of Decreased Expression of Serum miR-9 with Poor Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Med Sci Monit*. Jan 27; 22:289-94.

- Tanaka T, Ishigamori R. (2011) Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011:603740
- Teng H.-W., Yang S.-H., Lin J.-K. ve ark. (2012) CIP2A is a predictor of poor prognosis in colon cancer, *J. Gastrointest. Surg.* 16 1037–1047.
- Tivnan A. ve ark. . (2011) MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in neuroblastoma. *BMC Cancer*; 11:33.
- Tsai M.M., Wang C.S., Tsai C.Y. ve ark. (2014) MicroRNA-196a/-196b promote cell metastasis via negative regulation of radixin in human gastric cancer. *Cancer Lett.* ;351:222–231.
- Tsai S.C., Huang S.F., Chiang J.H. ve ark. (2017) The differential regulation of microRNAs is associated with oral cancer. *Oncol Rep* Sep;38(3):1613-1620.
- Velmurugan B.K., Wang H.K. ve ark. (2019) CIP2A overexpression in Taiwanese oral cancer patients. *Cancer Manag Res.* Apr 5;11:2589-2594
- Verdecia M.A., Huang H., Dutil E., Kaiser D.A. ve ark. (2000). Structure of the human anti-apoptotic protein surviving reveals a dimeric arrangement. *Nat. Struct. Biol.* 7 (7): 602–8.
- Vidigal JA, Ventura A. (2015) The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* Mar;25(3):137-47.
- W. Qu, W. Li, L. Wei, L. Xing, X. Wang, J. Yu, (2012) CIP2A is overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma, *Med. Oncol.* 29 113–118.
- Wang L, Romero M, Ratajczak P, Lebœuf C, Belhadj S, Peffault de Latour R, Zhao WL, Socié G, Janin A. (2013) Increased apoptosis is linked to severe acute GVHD in patients with Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant.* Jun;48(6):849-53.
- Warnakulasuriya S. (2009) Global Epidemiology of Oral and Oropharyngeal Cancer. *Oral Oncology*, Vol. 45, No. 4, pp. 309-316.
- Wu Y.K., Chen K.T., Kuo Y.B. ve ark. (2009) Quantitative detection of survivin in malignant pleural effusion for the diagnosis and prognosis of lung cancer. *Cancer Lett*, 273:331–5.
- Wulfken L.M., Moritz R., Ohlmann C. ve ark. (2011) MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One.*, 6:e25787.57

- Xiao C, Wang L, Zhu L, Zhang C, Zhou J. (2014) Curcumin inhibits oral squamous cell carcinoma SCC-9 cells proliferation by regulating miR-9 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 28;454(4):576-80.
- Xing ML, Lu YF, Wang DF, Zou XY, Zhang SX, Yun Z. (2016) Clinical significance of sCIP2A levels in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*;20(1):82-91.
- Y. Zhao, Y. Li, J. Han, T. Liu, Q. Guan, P. Zhao, L. Guo, K. Liu, D. (2014) Helicobacter pylori enhances CIP2A expression and cell proliferation via JNK2/ATF2 signaling in human gastric cancer cells, *Int. J. Mol. Med.* 33 703–710.
- Yadav N. ve ark. (2020) Study of Serum beta katenin Levels in Acute Myeloid Leukemia (AML) Patients *Int. J. of Adv. Res.* 8 (Mar). 188-194.
- Yixuan Y., Yan F., ve Huang Q. (2018) "MiR-200c inhibited the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by targeting Akt pathway and its downstream Glut1." *Archives of oral biology* 96 52-57.
- Yu CC, Hung SK, Lin HY, Chiou WY, Lee MS, Liao HF, Huang HB, Ho HC, Su YC. (2017) Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as an effectively radiosensitizing strategy for treating human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget.* Aug 2;8(40):68641-68653.
- Yuge K., Kikuchi E., Hagiwara M., Yasumizu Y., Tanaka Y., Kosaka T., Miyajima A., Oya M. (2015) Nicotine Induces Tumor Growth and Chemoresistance through Activation of the PI3K/Akt/mTOR Pathway in Bladder Cancer. *Mol. Cancer. Ther.*, 14 (9): 2112-2120.
- Zaid K.W. (2014) Immunohistochemical assessment of E-cadherin and beta-catenin in the histological differentiations of oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev*;15:8847–8853.
- Zekri A.R., Bahnassy A.A., Alam El-Din H.M., ve ark. (2011) Serum levels of β -catenin as a potential marker for genotype 4/hepatitis C-associated hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* Oct;26(4):825-31.
- Zhan T., Rindtorff N., Boutros M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene.*;36(11):1461-1473.
- Zhang C., Yao C., Li H., Wang G., He X. (2014) Combined elevation of microRNA-196a and microRNA-196b in sera predicts unfavorable prognosis in patients with osteosarcomas. *Int J Mol Sci.*,15:6544–6555.

Zhao P., Meng Q., Liu L.Z., You Y.P., Liu N., Jiang B.H. (2010) Regulation of survivin by PI3K/Akt/p70S6K1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 30;395(2):219-24.

Zhong, L.-P., J. Li, C.-P. Zhang, H.-G. Zhu, J. Sun, and Z.-Y. Zhang. (2007) Expression of E-cadherin in cervical lymph nodes from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Arch. Oral Biol.* Elsevier, 52:740–747.

Zini A., Czerninski R., Sgan-Cohen H.D. (2010) Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites *J Oral Pathol Med*; 39: 299-305.



FORMLAR

1. Oral Skuamöz Hücreli Karsinoma Hasta Takip Formu

Adı: Cinsiyet: Kadın ☐ Erkek ☐

Soyadı:

Tedavi Gördüğü Merkez:

Doğum Tarihi:

Telefon:

Adres:

Memleket:

Medeni Durum: Evli ☐ Bekar ☐

Çocuk Sayısı:

Sigara Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Günde paket sigara içiyorum.

Alkol Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Haftalık Alkol Kullanım Sıklığı:

Herhangi başka bir hastalığınız var mı? Diabet ☐ Hipertansiyon ☐ Kalp Hastalığı ☐

Sarılık (Hepatit) ☐ KOAH ☐ Bunların dışındaysa lütfen belirtiniz:

Daha önce geçirdiğiniz bir hastalık var mı? (Varsa yazınız):

Devamlı kullandığınız bir ilaç var mı? (Varsa yazınız):

Ailede kanser var mı? Evet ☐ Hayır ☐

1.derece akrabalarda (Anne, baba, kardeş, çocuk) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

2.derece akrabalarda (Dayı, teyze, amca, hala, kuzen) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

Hasta akrabanız tedavi oldu mu? Evet ☐ Hayır ☐ Yaşıyor mu? Evet ☐ Hayır ☐

Dişlerinizi günde kaç kez fırçalıyorsunuz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Fırçalamıyorum ☐

Yılda Kaç Defa Diş Muayenesine Gidersiniz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Gitmiyorum ☐

Ağız içinde yara v.b. sağlık probleminiz var mı? Evet ☐ Hayır ☐

Uçuk geçirdiniz mi? Evet ☐ Hayır ☐

OSHK Hasta Klinik/Patolojik Bulgular

Adı-Soyadı:

Özgeçmiş:

Soygeçmiş:

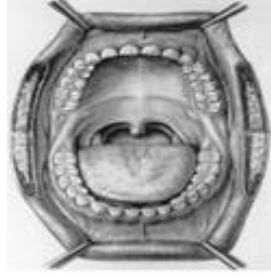
Şikâyeti:

Hikayesi:

Fizik Muayene:

Primer Tümör Bölgesi: Oral Kavite-Orofarenks

Sağ



Sol

T Evrelemesi: T1

☐

T2

☐

T3

☐

T4

☐

N Evrelemesi: N0

☐

N1

☐

N2

☐

N3

☐

Lenf Nodu Metastazı: Pozitif

☐

Negatif

☐

Tümör Evresi: I

☐

II

☐

III

☐

IV

☐

Patoloji Tümör Diferensiyasyonu: İyi

☐

Orta

☐

Zayıf

☐

Cerrahi Tedavi:

Tarih:

Kemoterapi:

Başlangıç ve Bitiş Tarihi:

Adjuvan Tedavi:

Başlangıç ve Bitiş Tarihi:

2. Fankoni Anemi Hasta Takip Formu

Adı: Cinsiyet: Kadın ☐ Erkek ☐

Soyadı: Yaş:

Tedavi Gördüğünüz Merkez:

Doğum Tarihi:

Telefon:

Adres:

Memleket:

Medeni Durum: Evli ☐ Bekar ☐

Çocuk Sayısı:

Sigara Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Günde paket sigara içiyorum.

Alkol Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Haftalık Alkol Kullanım Sıklığı:

Herhangi başka bir hastalığınız var mı? Diabet ☐ Hipertansiyon ☐ Kalp Hastalığı ☐

Sarılık (Hepatit) ☐ KOAH ☐ Bunların dışındaysa lütfen belirtiniz:

Daha önce geçirdiğiniz bir hastalık var mı? (Varsa yazınız):

Devamlı kullandığınız bir ilaç var mı? (Varsa yazınız):

Ailede kanser var mı? Evet ☐ Hayır ☐

1.derece akrabalarda (Anne, baba, kardeş, çocuk) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

2.derece akrabalarda (Dayı, teyze, amca, hala, kuzen) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

Hasta akrabanız tedavi oldu mu? Evet ☐ Hayır ☐ Yaşıyor mu? Evet ☐ Hayır ☐

Dişlerinizi günde kaç kez fırçalıyorsunuz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Fırçalamıyorum ☐

Yılda Kaç Defa Diş Muayenesine Gidersiniz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Gitmiyorum ☐

Ağız içinde yara v.b. sağlık probleminiz var mı? Evet ☐ Hayır ☐

Uçuk geçirdiniz mi? Evet ☐ Hayır ☐

Tedavi Gördüğü Merkez:

Yaş: Boy: Persantil: Tartı: Persantil:

Akraba Evliliği Var mı? Evet ☐ Hayır ☐ Kaçıncı Derece:

Kardeş Sayısı: Yaşayan: Ölen:

Kardeşler Arasında Fankoni Anemi Hastası Var mı? Var ☐ Yok ☐

Ailede Akrabalar Arasında Fankoni Anemi Hastası Var mı? Var ☐ Yok ☐

Hasta Fizik Muayene Bulguları

Hiperpigmentasyon: Var ☐ Yok ☐

Deride Kahverengi Lekeler: Var ☐ Yok ☐ **Sayı:**

Konjenital Anomaliler: Var ☐ Yok ☐

Ekstremitte Anomalisi: Var ☐ Yok ☐

Mikrosefali: Var ☐ Yok ☐

Kafa Çevresi: **Persantil:** **Zeka:**

Yüz Yapı Değişikliği: Var ☐ Yok ☐

Küçük Kafa-Küçük Gözler-Üçgen Yüz Tipi:

Mikroftalmi: **Ptoz:** **Strabismus:**

Nistagmus:

Dudak Damak Yarığı: Var ☐ Yok ☐

Kulak Anomalisi: Var ☐ Yok ☐

Dış Kulak Yolu: **Kulak Memesi:** Sağ ☐ Sol ☐

Sağırılık: Var ☐ Yok ☐ Bilmiyor:

Ağız Dış Yapı Değişikliği: Var ☐ Yok ☐ **Sivri Dişler:** **Çürükler:** **Diğer:**

Böbrek Anomalisi: Var ☐ Yok ☐

Kalp Anomalisi: Var ☐ Yok ☐

Diğer Anomaliler:

Büyüme Gelişim Geriliği: Var ☐ Yok ☐

Fankoni Anemi Hastası Genetik Tetkikler:

Kromozom Kırığı:

DEP%: **Nitrojen Mustard %:**

Biyokimyasal Tetkikler

Alfa Fetoprotein: **FetalHb:**

3. Sigara İçen Sağlıklı Gönüllü Takip Formu

Adı: Cinsiyet: Kadın ☐ Erkek ☐

Soyadı:

Tedavi Gördüğü Merkez:

Doğum Tarihi:

Telefon:

Adres:

Memleket:

Medeni Durum: Evli ☐ Bekar ☐

Çocuk Sayısı:

Sigara Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Günde paket sigara içiyorum.

Alkol Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Haftalık Alkol Kullanım Sıklığı:

Herhangi başka bir hastalığınız var mı? Diabet ☐ Hipertansiyon ☐ Kalp Hastalığı ☐

Sarılık (Hepatit) ☐ KOAH ☐ Bunların dışındaysa lütfen belirtiniz:

Daha önce geçirdiğiniz bir hastalık var mı? (Varsa yazınız):

Devamlı kullandığınız bir ilaç var mı? (Varsa yazınız):

Ailede kanser var mı? Evet ☐ Hayır ☐

1.derece akrabalarda (Anne, baba, kardeş, çocuk) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

2.derece akrabalarda (Dayı, teyze, amca, hala, kuzen) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

Hasta akrabanız tedavi oldu mu? Evet ☐ Hayır ☐ Yaşıyor mu? Evet ☐ Hayır ☐

Dişlerinizi günde kaç kez fırçalıyorsunuz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Fırçalamıyorum ☐

Yılda Kaç Defa Diş Muayenesine Gidersiniz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Gitmiyorum ☐

Ağız içinde yara v.b. sağlık probleminiz var mı? Evet ☐ Hayır ☐

Uçuk geçirdiniz mi? Evet ☐ Hayır ☐

FAGERSTRÖM NİKOTİN BAĞIMLILIK TESTİ

1. Günün ilk sigarasını sabah uyandıktan ne kadar sonra içersiniz?

a. İlk 5 dakika içinde (3 puan) b. 6-30 dakika içinde (2 puan) c. 31-60 dakika içinde (1 puan)

d. 1 saatten sonra (0 puan)

2. Sigara içmenin yasak olduğu yerlerde sigara içmemek sizi zorlar mı?

a. Evet (1 puan) b. Hayır (0 puan)

3. Günün hangi sigarasından vazgeçmek sizin için daha zordur?

- a. Sabah ilk içilen sigara (1 puan) b. Diğer zamanlarda içilen sigaralar (0 puan)

4. Günde kaç adet sigara içiyorsunuz?

- a. 31 ve daha fazla (3 puan) b. 21-30 adet (2 puan) c. 11-20 adet (1 puan) d. 10 ve daha az (0 puan)

5. Sabahları günün diğer zamanlarına göre daha fazla sigara içiyor musunuz?

- a. Evet (1 puan) b. Hayır (0 puan)

6. Yatmanızı gerektirecek kadar hasta olduğunuz zamanlarda da sigara içer misiniz?

- a. Evet (1 puan) b. Hayır (0 puan)

Değerlendirme Sonuçları

0-2: Çok az bağımlılık

3-4: Az bağımlılık

5: Orta derecede bağımlı

6-7: Yüksek bağımlılık

8-10: Çok yüksek bağımlılık

4. Sigara İçmeyen Sağlıklı Gönüllü Takip Formu

Adı:

Cinsiyet: Kadın ☐

Erkek ☐

Soyadı:

Tedavi Gördüğü Merkez:

Doğum Tarihi:

Telefon:

Adres:

Memleket:

Medeni Durum: Evli ☐ Bekar ☐

Çocuk Sayısı:

Sigara Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Günde paket sigara içiyorum.

Alkol Kullanımı: Evet ☐ Hayır ☐

Haftalık Alkol Kullanım Sıklığı:

Herhangi başka bir hastalığınız var mı? Diabet ☐ Hipertansiyon ☐ Kalp Hastalığı ☐

Sarılık (Hepatit) ☐ KOAH ☐ Bunların dışındaysa lütfen belirtiniz:

Daha önce geçirdiğiniz bir hastalık var mı? (Varsa yazınız):

Devamlı kullandığınız bir ilaç var mı? (Varsa yazınız):

Ailede kanser var mı? Evet ☐ Hayır ☐

1.derece akrabalarda (Anne, baba, kardeş, çocuk) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

2.derece akrabalarda (Dayı, teyze, amca, hala, kuzen) kanser varsa hastanın yakınlık derecesi:

Hasta akrabanız tedavi oldu mu? Evet ☐ Hayır ☐ Yaşıyor mu? Evet ☐ Hayır ☐

Dişlerinizi günde kaç kez fırçalıyorsunuz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Fırçalamıyorum ☐

Yılda Kaç Defa Diş Muayenesine Gidersiniz? 1 ☐ 2 ☐ 3 ve üzeri ☐ Gitmiyorum ☐

Ağız içinde yara v.b. sağlık probleminiz var mı? Evet ☐ Hayır ☐

Uçuk geçirdiniz mi? Evet ☐ Hayır ☐

GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın,

Dahil olacağınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “**Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda ve Risk Taşıyan Bireylerde PI3K ve Wnt Sinyal Yolakları İle İlişkili miRNA ve Protein Biyobelirteçlerin Araştırılması**”dır.

Ağız kanserleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’ nün tespit ettiği en tehlikeli altı kanser türü içinde yer almaktadır. Ağız kanserlerinin %90’ından fazlası Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) olarak tanımlanmaktadır. Vücudumuzdaki hücrelerin işlevi ve gelişiminin kontrolü sinyal yolağı adı verilen moleküler sistemlerin doğru çalışması ile gerçekleşir. Bu sinyal sistemlerinin bozulması kanser gelişimine neden olmaktadır. Bir bireyde kanser varlığının saptanması veya kanserin seyrinin takibi için vücut sıvılarındaki (kan, tükürük, idrar gibi) hücre sinyal sistemleriyle ilişkili çeşitli biyolojik yapılar (DNA, protein, miRNA) analiz edilmekte ve bunlara biyobelirteç denmektedir. Kanser tedavisinde erken teşhis hayati öneme sahiptir. Özellikle sigara bağımlısı bireylerde ve Fankoni anemi hastalarında ileride ağız kanseri görülme riski yüksektir ve erken tanı, iyileşme şanslarını büyük ölçüde arttıracaktır. Bu çalışmada ağız kanseri (OSHK) görülme riski taşıyan bireylerde erken tarama yapılabilmesi için tükürük ve kan örneklerinden kolay elde edilen, hızlı ve doğru sonuç veren tanı biyobelirteçlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Saptanacak biyobelirteçlerin ağız kanseri hastaları için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

- Bu çalışmaya ağız kanseri (OSHK) tanısı konmuş hastalar, ağız kanseri gelişme riski taşıyan sigara bağımlıları ve Fankoni anemi hastaları dahil edilecektir. Gönüllü gruplarından 1 tüp (6cc Kuru) tükürük ve 1 tüp kan (6cc EDTA) örneği alınacaktır.
- Araştırma için öngörülen süre 9 ay olup, çalışmada yer alacak 18 yaş altı gönüllü sayısı 15, sağlıklı kontroller ile birlikte toplam gönüllülerin sayısı ise 100’dür. Araştırmalar İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilecektir.
- Tükürük vermenin hiçbir yan etkisi yoktur, kan vermede ise yan etki ihtimali yok denecek kadar azdır. Bu yan etkiler çok az kanama ve morarma, nadiren ise çok hafif bir baygınlık hissidir.

Bu araştırma için size herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Bu çalışmada sizin hiçbir hukuki ve mali sorumluluğunuz yoktur; araştırma kapsamındaki bütün muayene ve testler için sizden ya da bağılı olduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından desteklenmektedir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğine bağlıdır. Çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da istediğiniz herhangi bir aşamada ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel bir duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı gerekli gördüğü durumlarda sizi araştırma dışı bırakabilir.

Araştırma sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır ve biyolojik örnekleriniz sadece **“Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda ve Risk Taşıyan Bireylerde PI3K ve Wnt Sinyal Yolakları İle İlişkili miRNA ve Protein Biyobelirteçlerin Araştırılması”** başlıklı bu çalışma için kullanılacaktır. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Araştırma yayınlanırsa bile kimlik bilgileriniz açıklanmayacaktır. Sadece araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilecektir.

Yürütmekte olduğumuz bu çalışma ile ilgili herhangi bir sorunuz olduğunda Mol. Bio. Zişan ASAL KILIÇ’dan (05336263127) bilgi alabilirsiniz.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

Moleküler Biyolog Zişan ASAL KILIÇ tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek, araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra araştırmaya “katılımcı” (gönüllü) olarak davet edildim. Açıklamayı dinledim, formu okudum. Eğer araştırmaya katılırsam hekim ile aramızda kalması gereken kişisel bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sonrasında kişisel bilgilerimin korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim.). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunu ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma ile ilgili herhangi bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda, herhangi bir saatte Prof. Dr. Nevin YALMAN’ı (İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, 05422839664) arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (gönüllü) olarak yer alma kararı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırma konusu hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla ve hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin Veli veya Vasinin,

Adı / Soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

EBEVEYN GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın Veli,

Çocuğunuzu dahil edeceğimiz çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “**Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda ve Risk Taşıyan Bireylerde PI3K ve Wnt Sinyal Yolakları İle İlişkili miRNA ve Protein Biyobelirteçlerin Araştırılması**”dır.

Ağız kanserleri Dünya Sağlık Örgütü(WHO)’ nün tespit ettiği en tehlikeli altı kanser türü içinde yer almaktadır. Ağız kanserlerinin %90’ından fazlası Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSHK) olarak tanımlanmaktadır. Vücudumuzdaki hücrelerin işlevi ve gelişiminin kontrolü sinyal yolağı adı verilen moleküler sistemlerin çalışması ile gerçekleşir. Bu sinyal sistemlerinden PI3K ve Wnt sinyal yolaklarının bozulması kanser gelişimine neden olmaktadır. miRNA ve proteinler sinyal yolaklarına etki ederek hücrelerin çalışmasını düzenleyen biyolojik yapılardır. Bir bireyde kanser varlığının saptanması veya kanserin seyrinin takibi için kan ve tükürük gibi vücut sıvılarındaki hücre sinyal sistemleriyle ilişkili biyolojik yapılar (miRNA, protein, gen) analiz edilmekte ve bunlara biyobelirteç denmektedir. Kanser tedavisinde erken teşhis hayati öneme sahiptir. Özellikle sigara bağımlısı bireylerde ve Fankoni anemi hastalarında ileride ağız kanseri (OSHK) görülme riski yüksektir ve erken tanı, iyileşme şanslarını büyük ölçüde arttıracaktır. Bu çalışmada OSHK görülme riski taşıyan bireylerde; PI3K ve Wnt sinyal yolakları ile ilişkili miRNA ve protein düzeyleri incelenecektir. Araştırmada ağız kanserinde erken tarama yapılabilmesi için tükürük ve kan örneklerinden kolay elde edilen, hızlı ve doğru sonuç veren tanı biyobelirteçlerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Saptanacak biyobelirteçler ağız kanseri hastaları için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından da katkı sağlayacaktır.

- Bu çalışmaya ağız kanseri (OSHK) tanısı konmuş hastalar, ağız kanseri gelişme riski taşıyan sigara bağımlıları ve Fankoni anemi hastaları dahil edilecektir. Gönüllü gruplarından 1 tüp (6cc Kuru) tükürük ve 1 tüp kan (6cc EDTA) örneği alınacaktır.
- Araştırma için öngörülen süre 9 ay olup, çalışmada yer alacak 18 yaş altı gönüllü sayısı 15, sağlıklı kontroller ile birlikte toplam gönüllülerin sayısı ise 100’dir. Araştırmalar İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilecektir.
- Tükürük vermenin hiçbir yan etkisi yoktur, kan vermede ise yan etki ihtimali yok denecek kadar azdır. Bu yan etkiler çok az kanama ve morarma, nadiren ise çok hafif bir baygınlık hissidir.

Bu araştırma için size herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Bu çalışmada sizin hiçbir hukuki ve mali sorumluluğunuz yoktur; araştırma kapsamındaki bütün muayene ve testler için sizden ya da bağılı olduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi) tarafından desteklenmektedir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin ve çocuğunuzun isteğine bağlıdır. Çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da istediğiniz herhangi bir aşamada ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel bir duruma yol açmayacaktır. Araştırıcı gerekli gördüğü durumlarda sizi araştırma dışı bırakabilir.

Araştırma sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır ve biyolojik örnekleriniz sadece“**Oral Skuamöz Hücreli Karsinomda ve Risk Taşıyan Bireylerde PI3K ve Wnt Sinyal Yolakları İle İlişkili miRNA ve Protein Biyobelirteçlerin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma için kullanılacaktır. Size ve çocuğunuzaait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz açıklanmayacaktır. Sadece araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilecektir. Yürütmekte olduğumuz bu çalışma ile ilgili herhangi bir sorunuz olduğunda Mol. Bio. Zişan ASAL KILIÇ’dan (05336263127) bilgi alabilirsiniz.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

Moleküler Biyolog Zişan ASAL KILIÇ tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek, araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra çocuğum araştırmaya “katılımcı” (gönüllü) olarak davet edildi. Açıklamayı dinledim, formu okudum. Eğer çocuğum araştırmaya katılırsa hekim ile aramızda kalması gereken kişisel bilgilerin gizliliğine büyük zen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sonrasında kişisel bilgilerimin korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağının bilincindeyim.). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla çocuğum araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunu ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma ile ilgili herhangi bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda, herhangi bir saatte Prof. Dr. Nevin YALMAN’ı (İştanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, 05422839664) arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Çocuğumun araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde çocuğumun “katılımcı” (gönüllü) olarak yer alması kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırma konusu hakkında bana ve çocuğuma yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla ve hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın çocuğumun katılmasını kabul ediyorum.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya Vesayet Altında Bulunanlar İçin Veli veya Vasinin,

Adı / Soyadı:

Adres:

Tel.:

İmza:

Tarih:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel-Faks:

Tarih ve İmza:

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ORAL SKUAMÖZ HÜCRELİ KARSİNOMDA VE RİSK TAŞIYAN
BİREYLERDE PI3K VE WNT SİNYAL YOLAKLARI İLE İLİŞKİLİ
MİRNA VE PROTEİN BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**4**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.tftr.org.tr
İnternet Kaynağı

%**1**

2

nek.istanbul.edu.tr:4444
İnternet Kaynağı

<%**1**

3

Submitted to Istanbul University
Öğrenci Ödevi

<%**1**

4

library.cu.edu.tr
İnternet Kaynağı

<%**1**

5

dspace.baskent.edu.tr:8080
İnternet Kaynağı

<%**1**

6

acikerisim.deu.edu.tr
İnternet Kaynağı

<%**1**

7

gentaurpdf.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

8

www.gentaurpdf.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

Submitted to Mansoura University

Yayınları

Ozturk Topcu T, Isiksacan N, Asal Kilic Z, Pehlivan S ve Gunaldi M. Evaluation of the relationship between antioxidant gene polymorphisms and breast cancer. (2020) Abstracts: 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium; December 10-14, 2019; San Antonio, Texas.

Isiksacan, N., Gunaldi, M., Pehlivan, M., Kurnaz, S., Kilic, A., Erdin, S., ve Pehlivan, S. (2017). Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Intron 4 VNTR Polymorphism in Patients with Breast and Gastrointestinal Cancers Cod: M217. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 55.

Özdemir, F. İnci, Zişan Asal, and Haluk Camcı. "Purification and characterization of recombinant *Geobacillus kaustophilus* protein Lon from *E. coli*." New Biotechnology 29 (2012): S85.

